



# **Expressão e purificação da proteína E3 do vírus chikungunya (CHIKV)**

Tatiana Priscila Coelho Pinto

Dissertação para obtenção do grau de Mestre em Microbiologia Médica

julho 2013



# Expressão e purificação da proteína E3 do vírus chikungunya (CHIKV)

**Tatiana Priscila Coelho Pinto**

Dissertação para obtenção do grau de Mestre em Microbiologia Médica

Orientadora: Professora Doutora Aida Esteves Simões

Unidade de Microbiologia Médica  
Instituto de Higiene e Medicina Tropical  
Universidade Nova de Lisboa

julho 2013

## **AGRADECIMENTOS**

À Professora Aida Esteves, minha orientadora nesta dissertação, pela sua ajuda e orientação no desenvolvimento dos métodos utilizados bem como a sua paciência nos momentos mais difíceis.

Aos Professores Ricardo Parreira e João Piedade pelo apoio no laboratório e conhecimentos que me transmitiram.

A todos os meus colegas de laboratório da Unidade de Microbiologia, pelo apoio e força que sempre me deram, pelos conselhos e esclarecimentos de dúvidas e também pelo excelente ambiente de companheirismo.

À Maria Teresa Marques e à Ângela por me transmitirem todos os seus conhecimentos acerca de diversas técnicas. Por me ajudarem, sempre que necessário no trabalho de laboratório e me darem força e um sorriso nos dias menos bons.

À Fernandinha, assim conhecida pelos alunos, pela sua preocupação constante em ter o material necessário sempre disponível e em condições, e por ouvir todos os meus desabafos quando tudo parecia correr mal.

À Maria Marques pelo seu sorriso de bom dia todos os dias e pelo carinho sempre demonstrado.

Às minhas colegas e amigas Diana Espadinha e Cláudia Gomes pelo apoio e carinho demonstrado desde o início do Mestrado.

Aos colegas e amigos Sandra Marques, e André Velez por todos os dias me ouvirem e partilharem comigo não só o laboratório mas também tudo aquilo que aprenderam, ajudando sempre que precisei.

A todas as minhas amigas e amigos mais antigos por fazerem parte da minha vida e permitirem que partilhe com eles não só todas as alegrias, mas também as tristezas sempre que preciso. Por serem o meu porto seguro e me lembrarem que não há motivo para estar mal.

Ao Carlos Perpétuo que me atura todos os dias, esteja de bom ou mau humor.

Ao Tiago por estar sempre do meu lado, dar-me força e apoiar nos bons e maus momentos ao longo destes anos.

À minha irmã que apesar do seu mau feitio e dos choques constantes, sei que se preocupa e está lá sempre que preciso.

E em especial à minha mãe, que além de apoiar todas as minhas escolhas, tornou possível alcançar não só este, como todos os graus académicos até aqui concretizados. Obrigado pela força, e pelo esforço que fizeste para que aqui chegasse. Sem ti nada disto seria possível. Obrigada por acreditares em mim.

E por fim, mas não menos importante, ao meu pai, por ser um exemplo que me tornou na pessoa que sou hoje e de quem fica uma eterna saudade.

## RESUMO

O vírus chikungunya (CHIKV) é um vírus de RNA, com invólucro, da família *Togaviridae*, transmitido por mosquitos *Aedes* spp. Distribuído por largas regiões de África e Ásia, causa grandes epidemias de artrite grave. A semelhança de sintomas com outras doenças como a dengue e a malária e a persistência de IgM específicas, dificultam o diagnóstico da infeção por CHIKV. A deteção no sangue de E3, uma glicoproteína viral secretada, a incluir num ensaio imunoenzimático poderá melhorar o diagnóstico nos países onde as técnicas de biologia molecular são de difícil acesso. Para testar a utilidade de E3 num ensaio de diagnóstico, esta deverá ser expressa em quantidade, purificada e usada para produção de anticorpos específicos.

Para expressar E3 numa forma solúvel, suscetível de ser purificada num único passo cromatográfico sem proteases, recorreu-se à estratégia da fusão com o domínio de ligação à quitina (CBD)-inteína (IMPACT™ System, NEB). A sequência codificadora de E3 foi amplificada a partir de RNA viral, clonada em pTYB21 e expressa em *E. coli* como uma proteína de fusão insolúvel de 64 kDa. A expressão a 12°C induzida por IPTG 0,1 mM aumentou a solubilidade de CBD-inteína-E3. A aplicação de lisados celulares em colunas de quitina originou a retenção de CBD-inteína-E3 na matriz. Porém, a autoclivagem da inteína na coluna, induzida com reagentes tiol, foi pouco eficiente e mesmo a proteína E3 separada não eluiu da coluna. E3 foi ainda expressa em *E. coli* com uma cauda de seis histidinas (E3[His]<sub>6</sub>) por clonagem no vetor pET28b(+). Lisados celulares aplicados em colunas de níquel permitiram a eluição de uma proteína de 9 kDa, compatível com a massa molecular estimada para E3[His]<sub>6</sub>, ainda que com outros contaminantes proteicos. A identidade da proteína de 9 kDa será confirmada pela indução de anticorpos com esta preparação e reatividade daqueles com células infetadas com CHIKV.

## ABSTRACT

Chikungunya virus (CHIKV) is an enveloped, positive strand RNA virus belonging to the family *Togaviridae*. Transmitted by *Aedes* spp mosquitoes, CHIKV causes large epidemics of severe arthritogenic disease in Africa and Asia and represents a serious threat in countries where vectors are present. Symptoms similarity with other diseases, *e.g.* dengue and malaria, along with CHIKV IgM persistence turns accurate CHIKV diagnosis a difficult task in low-income countries. Detection of E3, a small secreted viral glycoprotein, to be included in an immunoenzymatic test was envisaged as a possible improvement in CHIKV diagnosis. To test the diagnostic value of E3, recombinant E3 should be expressed and purified to generate antibodies.

In order to express CHIKV E3 in a soluble form amenable to purification by a single step affinity chromatography, the chitin binding domain (CBD)-intein fusion strategy without proteases (IMPACT™ System, NEB) was employed. The E3 coding sequence was amplified from viral RNA, cloned in pTYB21 and expressed in *E. coli* ER2566 as an insoluble 64 kDa CBD-intein-E3 fusion protein. Solubility was partially achieved by lowering the expression temperature to 12°C and the inducer (IPTG) concentration to 0.1 mM. Clarified cell lysate loaded onto a chitin column allowed ligation of the fusion protein but the intein-mediated cleavage efficiency was low and E3 failed to elute from the column as demonstrated by SDS-PAGE. E3 was further expressed with a six histidine tag, E3[His]<sub>6</sub>, employing the pET System (Novagen). E3[His]<sub>6</sub> was expressed in *E. coli* Rosetta (30°C, 0.4 mM IPTG) as a 9 kDa protein. Soluble cell extracts in 20-40 mM imidazole, applied onto a nickel column and eluted with 500 mM imidazole yielded a protein preparation enriched in the 9kDa protein. The 9 kDa will be used as antigen to generate antibodies that upon reaction with CHIKV infected cells will confirm its identity.

## Índice Geral

1. Introdução .....	1
1.1 Epidemiologia .....	1
1.1.1 Ciclo de transmissão.....	1
1.1.2 Distribuição Geográfica.....	2
1.2 A partícula viral.....	4
1.2.1 Estrutura e composição.....	4
1.2.2 Organização do genoma viral .....	4
1.3 Ciclo Replicativo.....	6
1.4 Doença.....	10
1.5 Tratamento e prevenção .....	11
1.6 Diagnóstico .....	12
1.7 Objetivos do estudo.....	14
2. Materiais e Métodos.....	16
2.1 Extração de RNA viral .....	16
2.2 Síntese de cDNA .....	16
2.3 Amplificação da sequência codificadora de E3 por PCR .....	17
2.4 Purificação dos Produtos de PCR .....	19
2.5 Digestão com enzimas de restrição .....	19
2.6 Clonagem da sequência codificadora de E3 em vetores plasmídicos .....	20
2.6.1 Ligaçã.....	20
2.6.2 Preparação de bactérias competentes e transformação por choque térmico...	20
2.6.3 Detecção de clones bacterianos transformados com plasmídeos recombinantes .....	21
2.7 Expressão da proteína de fusão CBD-inteína-E3.....	22
2.8 Purificação da proteína de fusão CBD-inteína-E3 .....	22
2.9 Expressão da proteína de fusão E3-[His] <sub>6</sub> .....	23
2.10 Purificação da proteína de fusão E3-[His] <sub>6</sub> .....	24
2.11 SDS-PAGE.....	25
2.12 Detecção de proteínas por <i>Western-blot</i> .....	26
2.12.1 Transferência de proteínas para a membrana de nitrocelulose.....	26

2.12.2 Bloqueio e incubação com anticorpos .....	26
3. Resultados.....	28
3.1 Clonagem da sequência codificadora da proteína E3 de CHIKV no vetor de expressão pTYB21 .....	28
3.2 Expressão da proteína de fusão CBD-inteína-E3.....	31
3.3 Purificação de E3 .....	35
3.4 Clonagem da sequência codificadora da proteína E3 de CHIKV no vetor de expressão pET28b(+) .....	37
3.5 Expressão da proteína de fusão E3-[His]6.....	39
3.6 Purificação de E3-[His]6.....	41
4. Discussão e Conclusões .....	45
5. Bibliografia .....	52
6. ANEXOS .....	61



## Índice de Figuras

Figura 1.1 – Distribuição Global do vírus Chikungunya, por país, em 2010. ....	3
Figura 1.2 – Representação esquemática da estrutura dos alfavírus.....	4
Figura 1.3 – Organização genômica do vírus Chikungunya e produtos proteicos. ....	6
Figura 1.4 - Ciclo replicativo dos Alfavírus .....	7
Figura 1.5 – Modelo da configuração das glicoproteínas dos alfavírus no retículo endoplasmático e membrana citoplasmática.....	9
Figura 3.1 - Amplificação da sequência codificadora da proteína E3 de CHIKV.....	29
Figura 3.2 – Análise de DNA plasmídico de clones transformantes de <i>E. coli</i> JM109 digerido com as enzimas de restrição PstI e BglII. ....	30
Figura 3.3 - Sequência de nucleótidos codificadora da proteína E3 de CHIKV presente na construção recombinante pTYB21.....	30
Figura 3.4 – Amplificação por PCR da sequência codificadora de E3 em transformantes de <i>E. coli</i> ER2566.....	31
Figura 3.5 – Expressão da proteína de fusão CBD-inteína-E3.....	32
Figura 3.6 – Solubilidade da proteína CBD-inteína-E3 após indução da expressão a diferentes temperaturas e diferentes concentrações de IPTG (mM).....	33
Figura 3.7 – Solubilidade da proteína CBD-inteína-E3 após indução da expressão com 0,1mM de IPTG a diferentes densidades óticas, a 12°C, durante a noite. ....	34
Figura 3.8 – Solubilidade da proteína CBD-inteína-E3 expressa em transformantes de células Origami após indução a DO <sub>600</sub> =0,6, 1mM de IPTG durante 24h a 37°C. ....	35
Figura 3.9 – Purificação da proteína E3 em coluna de quitina.....	36
Figura 3.10 – Purificação da proteína E3 em coluna de quitina. ....	37
Figura 3.11 – Amplificação da sequência codificadora de E3 por RT-PCR. ....	38
Figura 3.12 – Confirmação por PCR da presença da sequência codificadora de E3 em pET28b(+) de clones JM109 recombinantes .....	39
Figura 3.13 – Expressão de E3[His] <sub>6</sub> pelo clone recombinante de <i>E. coli</i> Rosetta induzida a DO <sub>600</sub> =1,0, com diferentes concentrações de IPTG, durante diferentes períodos de tempo e temperaturas de incubação de 30°C e 37°C. ....	40
Figura 3.14 – Solubilidade de E3[His] <sub>6</sub> expressa em <i>E. coli</i> Rosetta e BL21 após indução a DO <sub>600</sub> =1,0, com 0,1mM de IPTG, durante 4h a 30°C. ....	40

Figura 3.15 – Purificação em condições nativas de E3[His] <sub>6</sub> em colunas de níquel com imidazole 5 mM no tampão de ligação/lavagem .....	42
Figura 3.16 – Purificação em condições desnaturantes de E3[His] <sub>6</sub> em colunas de níquel .....	42
Figura 3.17 – Purificação em condições nativas de E3[His] <sub>6</sub> em colunas de níquel com imidazole 60 mM no tampão de ligação/lavagem. ....	43
Figura 3.18 – Purificação em condições nativas de E3[His] <sub>6</sub> em colunas de níquel com diferentes concentrações de imidazole no tampão de ligação/lavagem.....	44

## **Índice de Tabelas**

Tabela 2.1 – Condições utilizadas na reação de transcrição reversa a partir de RNA total. ....	17
Tabela 2.2 – Oligonucleótidos iniciadores para amplificação da sequência codificadora de E3 .....	18
Tabela 2.3 – Condições utilizadas para amplificação por PCR do fragmento de DNA correspondente à proteína E3.....	18

## ABREVIATURAS

<i>Ae.</i>	Género de mosquito <i>Aedes</i>
Amp	Ampicilina
APS	Persulfato de amónia
°C	Graus Celsius
Can	Canamicina
CBD	<i>Chitin binding domain</i>
cDNA	DNA complementar
Cis	Cisteína
Cm	Cloranfenicol
DEPC	Dietil pirocarbonato
DNA	Ácido desoxirribonucleico, do inglês <i>Deoxyribonucleic Acid</i>
dNTP	Desoxirribonucleótidos 5'-trifosfatados
DO	Densidade ótica
E1/E2	Glicoproteína do invólucro 1, Glicoproteína do invólucro 2
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Etilenodiaminotetracetato
<i>e.g</i>	Do latim, <i>exempli gratia</i> , que significa, como por exemplo
<i>Et al</i>	Do latim, <i>et alii</i> , que significa, e outros
EUA	Estados Unidos da América
x g	Aceleração da gravidade
h	Hora
His	Histidina
<i>i.e</i>	Isto é
IPTG	Isopropil-β-D-tiogalactopiranosídeo
kDa	Kilo(Daltons) = 10 <sup>3</sup> Daltons
KOAc	Acetato de potássio
K(p)b	Kilo(pares) de bases = 10 <sup>3</sup> (pares) de bases
LB	Meio de cultura <i>Luria Bertani</i>
MgCl <sub>2</sub>	Cloreto de magnésio

NaCl	Cloreto de sódio
min	Minuto
miniprep	Minipreparação
ml	Mililitro
mM	Milimolar
mRNA	Ácido ribonucleico mensageiro, do inglês <i>Messenger Ribonucleic Acid</i>
NaOH	Hidróxido de sódio
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
nm	Nanómetro = $10^{-9}$ metro
nsP1-4	Proteínas não estruturais
nt	Resíduo de nucleótido
NTR	Região não traduzida, do inglês, <i>Non-Translated Region</i>
ORF	<i>Open Reading Frame</i> (grelha de leitura aberta)
pb	Pares de base
PCR	Reação em cadeia da Polimerase, do inglês <i>Polymerase Chain Reaction</i>
PE2	Glicorpoteína precursora de E2
pH	Simétrico do logaritmo decimal da concentração hidrogeniônica de uma solução
poli-A	Cauda poliadenilada
RdRp	<i>RNA-dependent RNA polymerase</i>
RNA	Ácido ribonucleico, do inglês <i>Ribonucleic Acid</i>
RNase	Ribonuclease
rpm	Rotações por minuto
RT	<i>Reverse Transcription</i>
RT-PCR	Polimerização em cadeia da polimerase antecedita de transcrição reversa
SDS	Dodecilsulfato de sódio, do inglês <i>Sodium Dodecyl Sulphate</i>
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de Dodecilsulfato de Sódio e Poliacrilamida
seg	Segundos
SOC	Meio de cultura enriquecido para o crescimento bacteriano
t.a	Temperatura ambiente
TAE	Tampão Tris-acetato EDTA

TE	Tampão Tris-EDTA
TEMED	N, N, N', N' - tetrametiletilenodiamina
Tris	Tris(hidroximetil)aminometano
Tris-HCL	Tris Hidrocloreto
TSS	<i>Transformation and Storage Solution</i>
UV	Ultravioleta
vs	<i>versus</i>
μ	Micro, prefixo que designa 10 <sup>-6</sup>
μl	Microlitros
Wt	<i>Wild type</i>

## 1. Introdução

O vírus chikungunya (CHIKV), agente etiológico da febre chikungunya, é um vírus de RNA de polaridade positiva, com invólucro, pertencente ao género *Alphavirus* da família *Togaviridae*. À semelhança de outros membros desta família, o CHIKV é transmitido ao Homem por mosquitos infetados, sendo como tal incluído no grupo dos arbovírus (“*arthropode-borne viruses*”). Descrito pela primeira vez em 1952-53, na sequência de um surto de artrite na Tanzânia, África (66), o CHIKV foi considerado pouco relevante em termos de saúde pública durante mais de meio século. Na última década, recebeu particular atenção devido à extensão e gravidade dos surtos epidémicos nas ilhas do oceano Índico, Índia e sudeste Asiático e ao risco da introdução nos continentes Americano e Europeu.

### 1.1 Epidemiologia

#### 1.1.1 Ciclo de transmissão

Desde as primeiras epidemias em África e na Ásia, tornou-se evidente que a transmissão do CHIKV entre hospedeiros humanos ocorre através da picada de mosquitos vetores infetados. O CHIKV é mantido na natureza em dois ciclos de transmissão: silvático e urbano. O ciclo silvático está aparentemente, em larga medida, restringindo ao continente Africano e envolve principalmente primatas não-humanos, pequenos mamíferos e mosquitos *Aedes*, e.g. *Ae. furcifer-taylori*, *Ae. africanu* e *Ae. aegypti*, que habitam as florestas (38,60,86). A África rural é afetada por uma forma endémica caracterizada pela transmissão contínua entre populações com elevado grau de imunidade ou por pequenos surtos da doença quando a população de mosquitos aumenta em regiões com populações não imunes (60). No ciclo urbano, caracterizado por surtos de grandes dimensões no continente Asiático, observa-se transmissão humano-mosquito-humano sob a forma epidémica em populações com fraca imunidade, onde o Homem funciona como reservatório. Neste contexto, os principais vetores são mosquitos *Ae. aegypti* e, mais recentemente, também *Ae. albopictus* devido a uma mutação adaptativa no vírus (34,68,84,86). *Ae. aegypti* encontra-se em regiões

tropicais e subtropicais, enquanto *Ae. albopictus* tem uma distribuição geográfica mais alargada ocorrendo tanto em climas quentes como temperados. Os seus ovos são altamente resistentes e podem manter-se viáveis na estação seca, dando origem a larvas e adultos na época das chuvas seguinte (60).

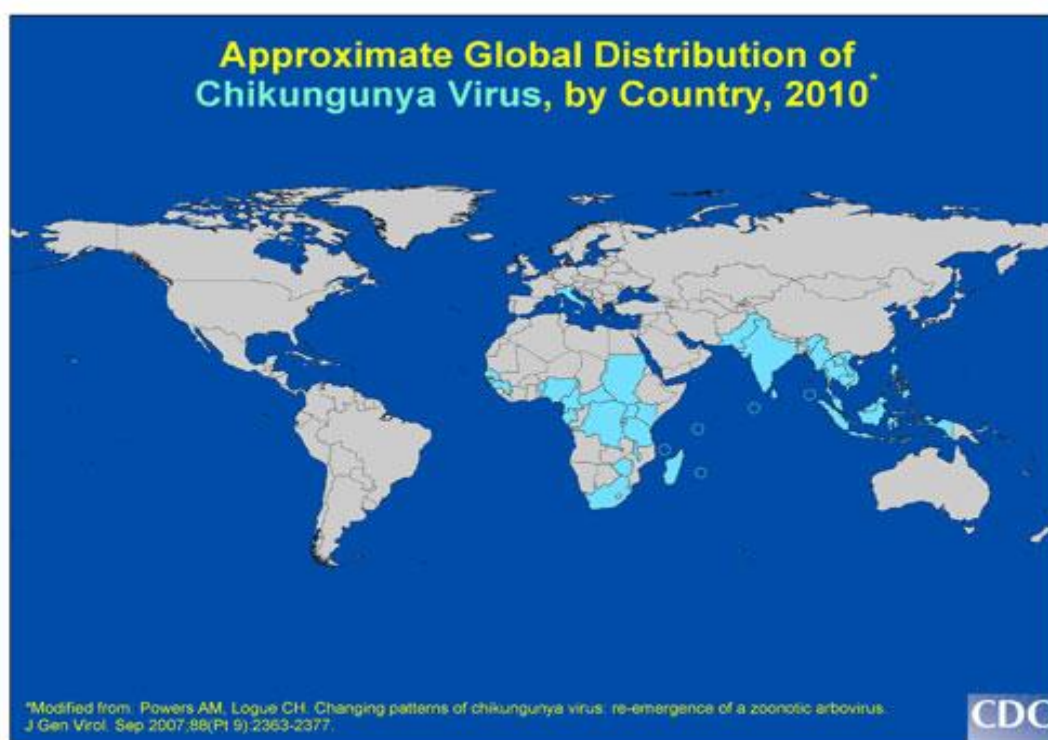
### **1.1.2 Distribuição Geográfica**

Após a descrição inicial do CHIKV em África em 1952-53, foram descritos casos de infeção humana e isolamento do vírus durante pequenos surtos na África Sub-sariana, designadamente na Tanzânia, Senegal, Guiné, Nigéria, Camarões, República Centro Africana, Gabão, República Democrática do Congo, Uganda Quênia, Angola, África do Sul, Zimbabué e Madagáscar (10,20). O primeiro surto confirmado de febre chikungunya na Ásia ocorreu nas Filipinas em 1954, com surtos subsequentes em 1956 e 1968. Na década de 70 e subsequentes, o vírus continuou a disseminar-se pelo sul e sudeste Asiático originando essencialmente pequenos surtos e casos esporádicos.

Após várias décadas de relativa baixa atividade, o CHIKV reemergiu em África e na Ásia com surtos de grandes dimensões. Assim, foram descritas epidemias urbanas em Kinshasa (República Democrática do Congo) em 2000 (58,78) e na Indonésia em 2001-03 (47). Em 2004, o vírus emergiu no Quênia nas cidades costeiras de Lamu e Mombaça, atingindo as ilhas Cômoros em 2005, onde dois terços da população foram infetados (69) e, subsequentemente, as ilhas Reunião igualmente com uma epidemia de grandes dimensões entre 2005 e 2007. No mesmo período observa-se a reemergência do CHIKV na Índia com 1,4 milhões de casos (3,34), sucedendo-se mais de meio milhão de casos anuais desde então neste país (53). A estirpe de CHIKV em circulação no oceano Índico em 2005-06 adquiriu uma mutação numa proteína do invólucro (E1-A226V) que permitiu a sua adaptação a *Ae. albopictus* com um aumento (50-100 vezes) da infeciosidade, disseminação e transmissão e, conjuntamente com a abundância deste vetor, deverá ter contribuído para a dimensão destes surtos (53,85,86). A Figura 1.1 mostra a distribuição geográfica do CHIKV em 2010.



Na Europa bem como na América, têm sido descritos na última década vários casos importados de infecção por CHIKV em indivíduos que regressam de países endêmicos. Em 2007, o CHIKV foi introduzido no norte de Itália por um viajante proveniente da Índia, resultando daí uma transmissão local por *Ae. albopictus*, com centenas de casos de doença (2,53). Em 2010, em França, este mesmo vetor foi responsável pela transmissão local de dois casos (28). *Ae. albopictus* encontra-se em vários países Europeus e juntamente com *Ae. aegypti* está bem estabelecido no sul dos Estados Unidos da América. À semelhança do que aconteceu em Itália, existe o risco de viajantes com virémia elevada, que regressem a estas regiões onde os mosquitos vetores estão bem estabelecidos, introduzam a circulação do CHIKV (91).

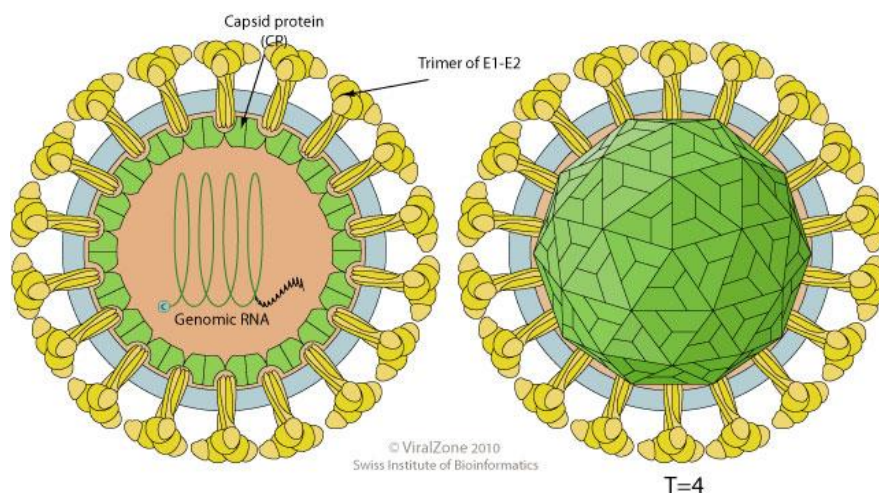


**Figura 1.1 – Distribuição Global do vírus Chikungunya, por país, em 2010.** Retirado de CDC ([http://www.cdc.gov/ncidod/dvbid/Chikungunya/CH\\_GlobalMap.html](http://www.cdc.gov/ncidod/dvbid/Chikungunya/CH_GlobalMap.html))

## 1.2 A partícula viral

### 1.2.1 Estrutura e composição

O CHIKV consiste em partículas virais icosaédricas, com aproximadamente 70 nm de diâmetro, revestidas por um invólucro lipídico onde estão inseridas as glicoproteínas virais E1 e E2. Estas estão associadas em heterodímeros que, por sua vez formam 80 trímeros, arranjados em simetria icosaédrica, que se projetam da superfície do virião semelhantes a pétalas de flor (Figura 1.2). O invólucro reveste uma nucleocápside icosaédrica, de aproximadamente 40 nm de diâmetro, constituída pela proteína da cápside, C, associada a uma molécula de RNA genómico viral (Figura 1.2).



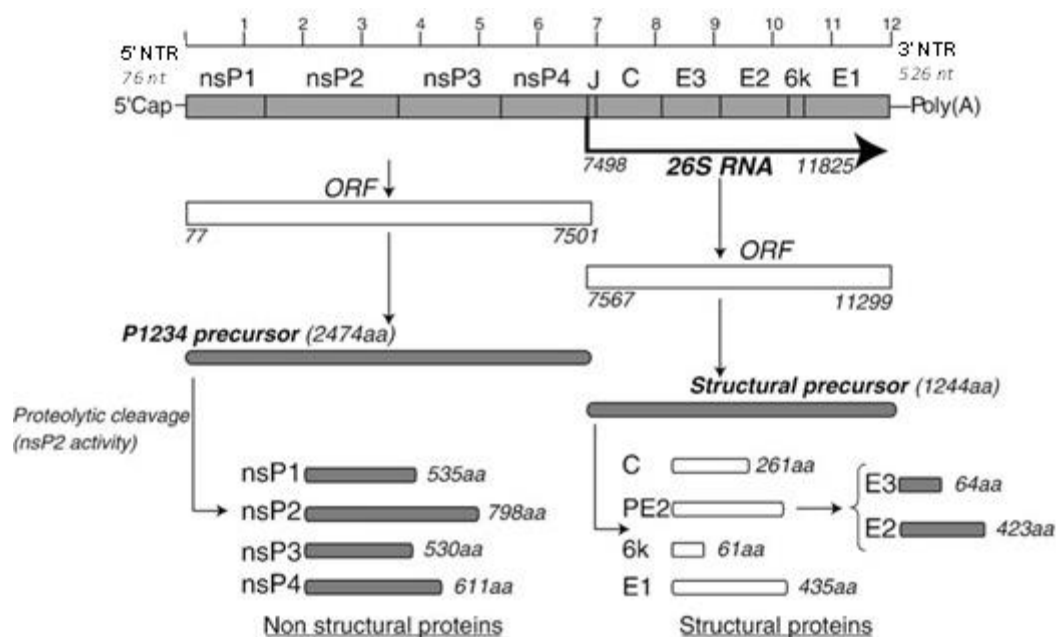
**Figura 1.2 – Representação esquemática da estrutura dos alfavírus.** Retirado de [viralzone.expasy.org](http://viralzone.expasy.org).

### 1.2.2 Organização do genoma viral

O genoma do CHIKV consiste numa molécula de RNA linear, de cadeia simples, polaridade positiva e com aproximadamente 11,8 kb (17,74,79). Este RNA genómico viral assemelha-se aos mRNAs celulares ao possuir uma estrutura *cap* no extremo 5' e uma cauda poli\_A 3' (40). Existem duas grelhas de leitura abertas (ORFs), uma ocupa

os dois terços 5' do genoma e codifica a poliproteína que é processada por proteólise, para dar origem às proteínas não estruturais (nsP1, nsP2, nsP3 e nsP4) multifuncionais e que formam a replicase viral. Na realidade, são traduzidas duas poliproteínas não estruturais, uma mais abundante constituída por nsP123 e outra em menor quantidade (nsP1234) produzida por um mecanismo de *read-through* do codão de terminação existente no final da sequência codificadora de nsP3 (79). A outra ORF, separada da primeira por uma região de junção, ocupa aproximadamente o terço 3' do genoma e codifica uma segunda poliproteína que vai gerar, por processamento proteolítico, as proteínas estruturais [C, E1, PE2 (E3+E2) e 6K] (40) (Figura 1.3). Nos alfavírus, a tradução do RNA genómico viral (49S) dá origem à poliproteína não estrutural nsP1-P4, enquanto a poliproteína estrutural é traduzida a partir de mRNA subgenómico (26S) transcrito a partir de um promotor situado na região de junção (29) (Figura 1.3).

A região codificante é flanqueada nos extremos 5' e 3' por sequências não traduzidas, respetivamente 5'NTR e 3'NTR. A primeira de 76 resíduos nucleotídicos (nt), forma duas estruturas *stem-loop* e funciona nos alfavírus como promotor para a síntese de RNA genómico e antígenómico (22). A segunda com cerca de 500 nucleótidos possui vários elementos de sequência repetida de aproximadamente 35 nt (RSEs) que nos alfavírus têm sido associados à regulação da síntese do RNA viral, mas com papel ainda mal conhecido. O RNA genómico do CHIKV possui uma sequência de 19 nt que precede a cauda poli\_A, altamente conservada entre os alfavírus e que poderá ser uma sequência de reconhecimento da replicase viral (76).



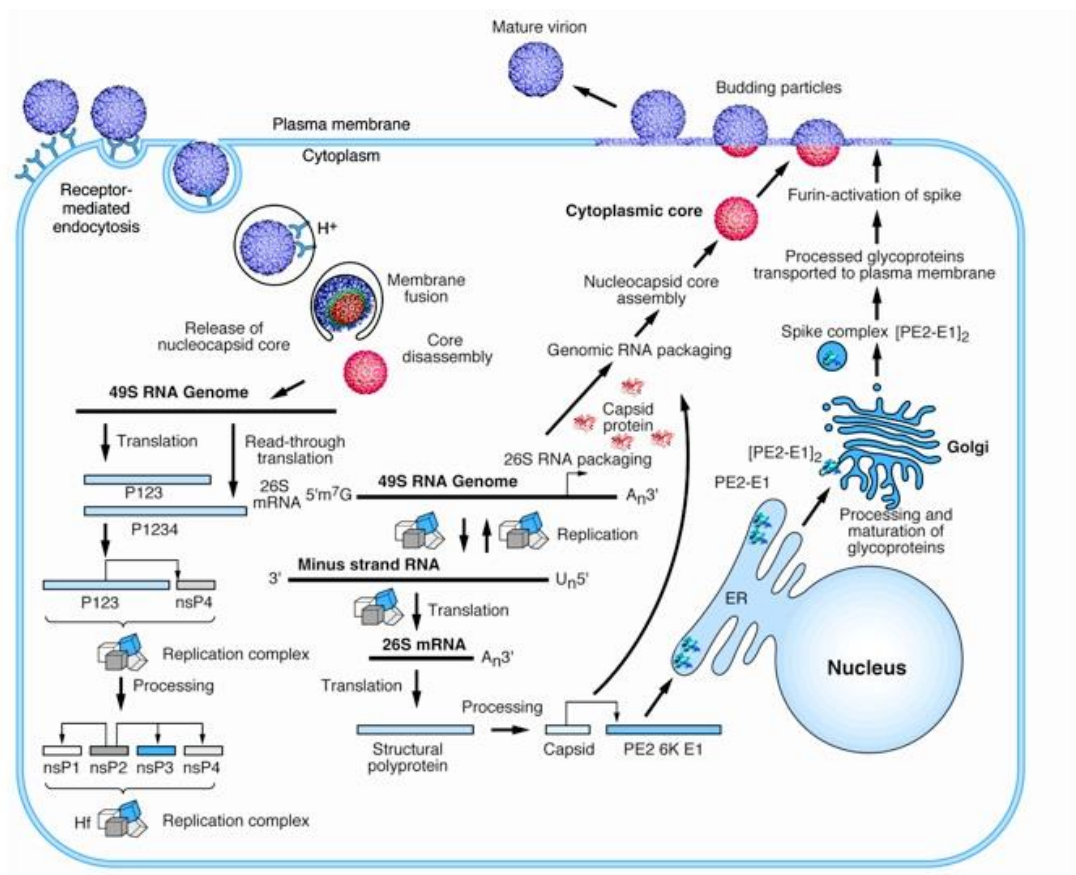
**Figura 1.3 – Organização genômica do vírus Chikungunya e produtos proteicos.** Adaptado de Solignat M, *et al.*, 2009.

### 1.3 Ciclo Replicativo

O tropismo do CHIKV nos seres humanos ainda não está completamente definido. Apesar de causar virémia elevada ( $10^8$  cópias de RNA/ml), o CHIKV não se replica em linfócitos e monócitos primários, no entanto os macrófagos derivados de monócitos são suscetíveis à infecção e em modelo símio funcionam como reservatório do vírus (45,78). O CHIKV infeta células epiteliais e endoteliais e fibroblastos humanos (14), bem como uma vasta gama de linhas celulares, excluindo as monocitóides e linfóides, causando efeito citopático extenso associado à indução de apoptose (78).

Para entrar nas células hospedeiras o CHIKV liga-se, através da glicoproteína E2 do invólucro viral, a recetores na superfície da célula ainda não identificados. Após ligação o vírus é internalizado através de endocitose mediada por recetores, por um mecanismo independente de clatrina, dependente de colesterol e da acidificação dos endossomas (Figura 1.4) (4,26). Por outro lado, CHIKV infeta produtivamente células deficientes em caveolina (76). Uma vez exposto ao pH ácido dos endossomas, o heterodímero E1-

E2 sofre alterações conformacionais irreversíveis, E1 dissocia-se de E2 e forma um arranjo de homotrímeros com atividade fusogénica. A fusão do invólucro viral com a membrana do endossoma conduz à libertação da nucleocápside no citoplasma. A descapsidação das nucleocápsides dos alfavírus ocorre muito rapidamente após a penetração no citoplasma, sendo assistida pelo RNA ribossomal 60S, que interage com a proteína C e facilita a descapsidação e a libertação do RNA viral para iniciação da síntese proteica (92).



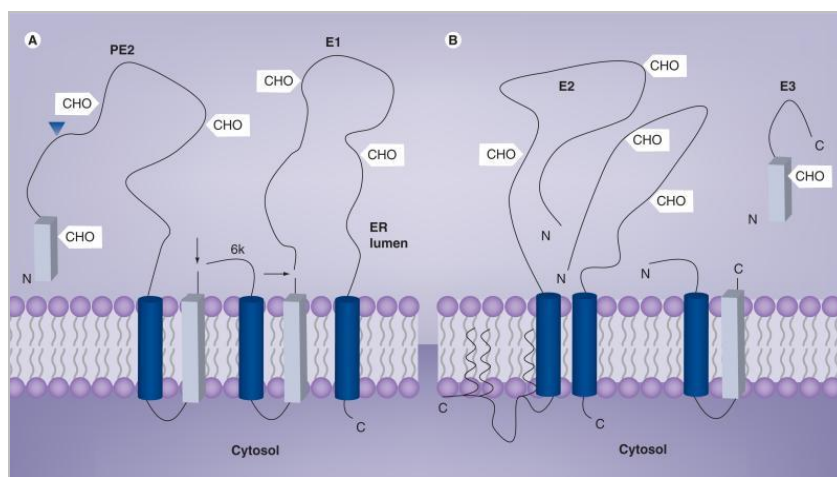
**Figura 1.4 - Ciclo replicativo dos Alfavírus.** Retirado de ([http://bilbo.bio.purdue.edu/~viruswww/Kuhn\\_home/research.php](http://bilbo.bio.purdue.edu/~viruswww/Kuhn_home/research.php))

Nos alfavírus o RNA genómico viral é diretamente traduzido pela maquinaria de tradução da célula hospedeira, dando origem a duas poliproteínas diferentes nsP123 e nsP1234 (67). Esta última surge por *readthrough* do codão de terminação na posição 7499/7051 que ocorre com uma eficiência de 10-20%, pelo que o produto predominante é nsP123. nsP4, a polimerase de RNA dependente de RNA (RdRp), é separada de

nsP123 pela atividade proteolítica do domínio nsP2, o qual atua em *cis* no contexto nsP123. A replicação do RNA viral dos alfavírus decorre em associação com vacúolos citoplasmáticos e membranas dos endossomas, sendo conduzida pelos complexos replicase formados pelas proteínas não estruturais nestas membranas (43). É largamente aceite que o processamento diferencial e temporal da poliproteína não estrutural por nsP2 origina complexos de replicação com composição e especificidades distintas. Assim a síntese da cadeia com polaridade negativa utiliza RNA genómico como matriz e requer um complexo de replicação composto por nsP123 e nsP4, este não é eficaz a sintetizar RNA de polaridade positiva (71). À medida que decorre a infeção, nsP123 é eficientemente cortada em *trans* e o complexo de proteínas individuais sintetiza a partir de RNA de polaridade negativa, na fase tardia da infeção, RNA de polaridade positiva, *i.e.* RNA genómico e RNA subgenómico, este último num excesso de aproximadamente 3 vezes. Para além de serem parte integrante do complexo replicase e das funções enzimáticas associadas de RdRp e adenililtransferase terminal (nsP4), guanina-7-metiltransferase e guaniltransferase (nsP1), de helicase, trifosfatase de nucleósidos e protease (nsP2), fosfatase de ADP-ribose 1''-fosfato (nsP3) (37), as proteínas não estruturais dos alfavírus possuem efeitos moduladores na célula hospedeira. Nas células de vertebrado infetadas por alfavírus observa-se uma marcada inibição da expressão das proteínas celulares mediada por nsP2 nos alfavírus do Velho Mundo, onde o CHIKV se inclui (23,53). Nestes vírus, nsP2 é ainda responsável pela antagonização da resposta imune inata ao inibir a indução da síntese de interferão tipo I (7).

O mRNA subgenómico 26S é o transcrito usado na síntese das proteínas estruturais dos alfavírus (Figura 1.3). No CHIKV, esta ORF codifica uma poliproteína precursora (C-PE2-6K-E1) de 1244 resíduos de aminoácidos que é processada por enzimas virais e celulares, durante e após a tradução, para dar origem às proteínas estruturais individuais. A primeira proteína a ser sintetizada é a proteína da cápside (C), de 261 resíduos de aminoácidos (aa) e uma massa molecular 30 kDa. Esta proteína possui, do extremo amina para o extremo carboxilo, um domínio de hélice alfa envolvido na montagem da nucleocápside, um domínio de ligação a RNA, um domínio de protease serínica e uma região de ligação à proteína do invólucro E2. A proteína da cápside funciona como autoprotease em *cis* permitindo a sua separação do polipéptido nascente (32). O extremo

amina da restante poliproteína funciona então como sequência sinal conduzindo à translocação da glicoproteína precursora de E2 (PE2) para o retículo endoplasmático (24). A poliproteína PE2-6K-E1 traduzida em associação com o RE é cortada pela sinalase celular para produzir sucessivamente a glicoproteína PE2, 6K e a glicoproteína E1 (Figura 1.5). PE2 e E1 formam heterodímeros que são transportados para a superfície da célula. Durante este processo, PE2 e E1 são glicosiladas e o extremo carboxilo de PE2/E2 sofre palmitoilação e fosforilação ficando acessível no lado citoplasmático do RE para posterior interação com a proteína da cápside (36,48). Durante o transporte na via secretória, PE2 é cortado por uma enzima do *trans*-Golgi, a furina, para formar E2 e E3 (Figura 1.5). PE2 não cortado é transportado até à superfície da célula e pode ser incorporado nas partículas virais mas estas não são infecciosas. E3 é uma pequena glicoproteína (64 resíduos de aminoácidos, cerca de 11 kDa) que no CHIKV, à semelhança da maioria dos alfavírus, é secretada pelas células infectadas. Para além de 4 cisteínas conservadas nos alfavírus, E3 de CHIKV possui 2 cisteínas adicionais inseridas num motivo PPCIXCC. No vírus Sindbis, E3 possui atividade de dissulfeto isomerase que poderá contribuir para a formação de ligações dissulfureto e aquisição da estrutura conformacional correta das glicoproteínas do invólucro (57).



**Figura 1.5 – Modelo da configuração das glicoproteínas dos alfavírus no retículo endoplasmático e membrana citoplasmática.**

**(A) Configuração de PE2, 6k e E1 após clivagem por sinalase no retículo endoplasmático. As setas representam o local de clivagem por sinalase no retículo endoplasmático. O triângulo azul representa o local de clivagem de PE2 pela furina.**

**(B) Configuração da glicoproteína na membrana citoplasmática após a clivagem de PE2 pela furina, resultando em E3 e E2. Os locais de palmitoilação no lado citoplasmático de E2 estão mostrados como linhas onduladas na bicamada membrana.**

As sequências sinal no polipéptido estão indicadas como blocos retangulares enquanto as sequências de paragem da transferência são indicadas como cilindros. Retirado de Jose J, 2009.

A montagem do virião dos alfavírus inicia-se com a formação da nucleocápside no citoplasma. O modelo mais consensual propõe que a proteína da cápside forme dímeros que se associam ao RNA genómico e que posteriormente oligomerizam para formar a nucleocápside (83). Pensa-se que as nucleocápsides difundam livremente até à membrana citoplasmática, onde a aquisição do invólucro lipídico por gemulação requer a interação entre a proteína da cápside e o domínio citoplasmático de E2 (81) (Figura 1.4).

## **1.4 Doença**

A infecção humana por CHIKV surge na sequência da picada de mosquitos *Aedes sp.* infetados e, ao contrário da maioria dos outros arbovírus, origina manifestações clínicas em cerca de 80% dos indivíduos infetados (63). Após a infecção, segue-se um período de incubação médio de 2 a 4 dias, ao fim do qual surge abruptamente febre elevada, artralgia e mialgia graves, frequentemente acompanhadas de dores de cabeça, fotofobia e erupção (39). A poliartralgia dolorosa e incapacitante, que atinge particularmente as articulações das extremidades dos membros, é uma característica da infecção por CHIKV e está na base da designação do vírus. “Chikungunya” significa em Maconde “o que se dobra” sendo usado para referir a postura resultante da artralgia grave provocada pela infecção viral (80). A infecção por CHIKV é auto-limitante e os sintomas agudos geralmente resolvem-se em 1-2 semanas. No entanto muitos doentes desenvolvem artralgia persistente que pode durar vários meses ou anos, estando a probabilidade de tal



acontecer associada à idade (75). Em alguns casos epidêmicos foram identificadas complicações neurológicas, cardiovasculares, renais, hepáticas e oculares associadas a doentes com CHIKV (19). Durante a epidemia das ilhas Reunião constatou-se a transmissão vertical do CHIKV, originando encefalopatias nos recém-nascidos. Durante muito tempo a infecção por CHIKV não foi associada a casos fatais. No entanto, nas epidemias que ocorreram a partir de 2005, 1 em 1000 casos resultaram em morte sendo o grupo de risco constituído por recém-nascidos e idosos ou adultos com outros problemas clínicos subjacentes (27,82). As manifestações hemorrágicas, comuns na infecção pelo vírus da dengue, são raras no CHIKV.

## **1.5 Tratamento e prevenção**

Não existem fármacos específicos para o tratamento da infecção por CHIKV, sendo recomendados anti-inflamatórios não esteroides para minorar a artralgia. Porém, a reemergência do CHIKV levou à avaliação de fármacos antivirais inespecíficos, como a ribavirina e a cloroquina, que têm atividade antiviral em culturas celulares (9,41), sem que fossem demonstrados resultados conclusivos sobre a sua eficácia *in vivo* (8,46,64). Considerando a indisponibilidade de fármacos específicos e eficazes para o tratamento de CHIKV, a vacinação será o meio mais eficaz de proteger populações em risco de contraírem a infecção. Apesar de não estarem bem definidos os mecanismos imunitários de proteção, dados epidemiológicos sugerem que a infecção confere imunidade para a vida, existindo pouca evidência de variação antigénica e escape imune. Por outro lado, estudos de transferência adaptativa indicam que os anticorpos neutralizantes contra CHIKV protegem da infecção por este vírus e que a sua indução poderá ser a base de uma vacina protetora (14).

No início da década de 70, foram produzidas várias vacinas inativadas, indutoras de anticorpos neutralizantes e sem efeitos secundários (18,33). Nos anos 80, foi desenvolvida uma vacina de vírus atenuado por passagem em culturas celulares que não passou à fase II de ensaios clínicos devido a provocar artralgia transitória em 8% dos indivíduos vacinados (20) e poder ser transmitida por *Ae. aegypti* (87). Outra forma de

atenuação consistiu na construção de alfavírus quiméricos tendo proteínas estruturais de CHIKV num contexto de proteínas não estruturais de outros alfavírus, *e.g.* vírus Sindbis, (90), mas a sua capacidade para infectar os vetores de CHIKV votou o seu abandono (61).

Face aos problemas de segurança colocados pelas vacinas atrás referidas, outras abordagens de vacinação surgiram, nomeadamente vacinas de DNA (52) e *virus-like particles* (1). Estas últimas são seguras devido à ausência de genoma viral e por simularem a estrutura da partícula viral são altamente imunogénicas, tendo conferido proteção contra a infeção por CHIKV em modelo símio (1). Estas vacinas apresentam porém o inconveniente de serem de produção dispendiosa e de difícil acesso aos países mais atingidos pelo CHIKV ou em risco. Não existindo atualmente qualquer vacina contra o CHIKV licenciada, a prevenção assenta no controlo das populações de mosquitos vetores através de medidas de redução dos criadouros, uso de larvicidas e pulverização aérea com piretróides ou organofosfatos. O uso de vestuário protetor e redes mosquiteiras também são aconselhados para proteger da picada de mosquitos infetados. No entanto, estas medidas são insuficientes para o controlo da transmissão, mesmo nos países desenvolvidos, e a vacinação deverá ser implementada num futuro próximo.

## **1.6 Diagnóstico**

O diagnóstico da infeção por CHIKV é difícil uma vez que as manifestações clínicas são muito semelhantes às de outras doenças, como sejam as provocadas por outros alfavírus artríticos ou malária endémica. No entanto, é com a febre de dengue que os sintomas mais se assemelham, o que acrescido da sobreposição geográfica dos dois vírus e da partilha dos mosquitos vetores levou a que surtos de CHIKV tenham sido erradamente atribuídos a dengue (11). Assim, o diagnóstico da infeção por CHIKV deve ser baseado em critérios clínicos, geográficos e laboratoriais. O aparecimento agudo de febre e artralgia grave sem outras causas médicas é considerado um caso possível, o qual se transforma em caso provável quando o doente vive ou visitou uma região endémica. No entanto a confirmação laboratorial é essencial. O diagnóstico laboratorial

baseia-se essencialmente na cinética da virémia e da resposta imune humoral do hospedeiro humano. Na fase aguda da doença, os testes laboratoriais empregues visam detetar i) o genoma viral em amostras de soro através de RT-PCR convencional (59) ou de RT-PCR em tempo real (55,56); ii) anticorpos IgM por ELISA de captura de IgM (*Immunoglobulin M Antibody (IgM) capture enzyme-linked immunosorbent assay*, MAC-ELISA) e por imunofluorescência indireta (IFA); iii) aumento de 4 vezes do título de IgG determinado por ELISA em duas amostras de soro colhidas com pelo menos duas semanas de intervalo; e iv) isolamento do vírus em culturas de células de mamífero ou de mosquito ou ainda inoculação intracerebral de murganhos recém-nascidos.

O isolamento do vírus, para além de requerer condições de segurança laboratorial de nível BSL3, está limitado aos primeiros 2-3 dias da doença antes do aparecimento de anticorpos (54). As técnicas baseadas em RT-PCR proporcionam um diagnóstico rápido e sensível. No entanto, só permitem detetar ácido nucleico viral até ao dia 5-7 após aparecimento dos sintomas, requerem laboratórios bem equipados, recursos humanos bem treinados e os custos associados são relativamente elevados. Ainda, um estudo realizado pela *European Network for Diagnostics of Imported Viral Diseases* que inclui 24 laboratórios de 15 países Europeus revelou variações consideráveis de sensibilidade e especificidade nos ensaios de RT-PCR efetuados (16).

Os testes de ELISA para deteção de anticorpos específicos anti-CHIKV são menos exigentes em termos de infraestruturas laboratoriais e permitem, teoricamente, detetar IgM entre 2 e 7 dias após o aparecimento da doença e IgG por volta do dia 6 (13,54). Os ensaios baseados em IgM apresentam a desvantagem destes anticorpos poderem ser detetados até pelo menos 18 meses após a infeção, o que pode comprometer o seu valor como marcador da infeção aguda por CHIKV (30). Atualmente, existem vários ensaios serológicos comerciais para a deteção de IgM anti-CHIKV, os testes rápidos imunocromatográficos (ICT) da CTK Biotech (EUA) e da Standard Diagnostics (SD) (Coreia), MAC ELISA da Standard Diagnostics e o teste de imunofluorescência (IFA) da EUROIMMUN AG (Alemanha). Um estudo comparativo entre IFA da EUROIMMUN e ICT da CTK Biotech revelou que a sensibilidade da deteção de IgM

nos primeiros dias da doença é muito variável, dependendo essencialmente da estirpe de vírus ou da fonte de antígeno usada no ensaio (93). Igualmente, um outro estudo que avaliou a eficácia no diagnóstico da fase aguda da doença dos ensaios comerciais baseados em anticorpos ICT SD e MAC ELISA SD demonstrou uma sensibilidade muito baixa para ambos (cerca de 3,9%) e a sua inadequação para o diagnóstico da febre chikungunya aguda (5). Estes estudos evidenciaram a importância de novos testes de diagnóstico comerciais baseados em antígeno/RNA para o diagnóstico rápido e sensível numa fase em que os doentes ainda apresentam viremia.

Um método *in-house* de ELISA para captura de antígenos permitiu a deteção de antígenos de CHIKV em amostras de soro de forma específica mas menos sensível que o RT-PCR em tempo real (45% versus 61% das amostras) (72), provavelmente devido à presença de anticorpos nas amostras que interferiram na captura do antígeno.

## **1.7 Objetivos do estudo**

Considerando as limitações dos ensaios de diagnóstico laboratorial atrás discutidas, designadamente i) a duração prolongada de IgM específicas de CHIKV que pode pôr em causa o seu valor como marca de infeção em curso ou recente, ii) o período curto de viremia e iii) os requisitos logísticos associados aos testes de RT-PCR para deteção de ácido nucleico viral limitantes da sua utilização, nomeadamente nos países de fracos recursos que são atualmente os mais afetados por este vírus, é necessário um teste de diagnóstico precoce, sensível, específico, fácil de executar e de baixo custo. Um teste de antigenemia tendo como alvo uma proteína viral circulante, naturalmente pouco imunogénica, poderá constituir a base de um teste de diagnóstico na fase inicial da infeção. A proteína E3 de CHIKV, resultante da proteólise da poliproteína estrutural e descrita como sendo secretada pelas células infetadas, eventualmente poderá ser o alvo deste teste.

Neste contexto, o presente estudo tem como objetivo expressar e purificar a proteína E3 do CHIKV. Para tal pretendemos:

- 1) amplificar por RT-PCR a sequência codificadora da proteína E3, a partir do genoma viral, usando *primers* específicos que permitam a adição de locais de restrição para posterior clonagem;
- 2) clonar a sequência amplificada no plasmídeo pTYB21 (sistema IMPACT, New England Biolabs), a jusante e na mesma grelha de leitura da sequência codificadora da inteína Sce VMA1, a qual, por sua vez, está fundida no extremo 5' com uma sequência codificadora de um domínio de ligação à quitina, que possibilita a sua expressão em *E. coli* como proteína de fusão e deverá facilitar a sua purificação por cromatografia de afinidade,
- 3) determinar as condições que permitam expressar E3 na forma solúvel em *E. coli*, e
- 4) purificar E3 por cromatografia de afinidade em colunas de quitina.

Numa fase subsequente a este trabalho, a proteína obtida seria usada na produção de anticorpos específicos que permitissem avaliar a cinética de E3 secretada em culturas celulares/animais infetados e o seu potencial como base de um ensaio imunoenzimático de captura de antígeno.

## **2. Materiais e Métodos**

### **2.1 Extração de RNA viral**

Para a obtenção de RNA viral, procedeu-se à extração de RNA total do sobrenadante de uma cultura de células Vero infectadas com CHIKV estirpe S27. Utilizou-se o sistema de extração comercial *INSTANT Virus RNA Kit* (Analytikjena, Alemanha). O protocolo experimental foi realizado de acordo com as instruções recomendadas pelo fabricante. Essencialmente, consistiu num passo de lise em que foram adicionados 450 µl de solução de lise (RL) a 150 µl de amostra (manipulação efetuada em câmara de fluxo laminar num laboratório de segurança biológica BSL-3). A mistura foi homogeneizada vigorosamente 3 a 4 vezes num agitador de tipo vórtex, em pulsos de 10 seg., seguido de um período de incubação de 15 min. à temperatura ambiente com agitação intermitente cada 5 min. A extração prosseguiu com a adição de 600 µl de tampão de ligação (RBS) e homogeneização com vórtex. A mistura resultante foi aplicada numa coluna de purificação, previamente acoplada a um tubo coletor, seguindo-se centrifugação a 10000 xg, 1 min. As lavagens da coluna, para remoção de contaminantes, foram efetuadas pela adição de 500 µl de solução de lavagem HS e centrifugação a 10000 xg, 1 min, seguida de 650 µl da solução de lavagem LS e nova centrifugação. Antes da eluição fez-se uma centrifugação a 13400 xg para remoção do etanol presente nas soluções de lavagem. O RNA foi eluído pela adição à coluna de 30 µl de água sem RNases, seguida de incubação à temperatura ambiente, 2 min., e centrifugação a 6000 xg, 1 min. O eluato foi dividido em alíquotas de 5 µl que se guardaram a -80°C até posterior utilização.

### **2.2 Síntese de cDNA**

Para a síntese de cDNA a partir do RNA extraído como descrito na secção anterior, foi utilizado o *kit* comercial *RevertAid<sup>TM</sup> H Minus First Strand cDNA synthesis* (Fermentas, Lituânia). O protocolo experimental foi realizado de acordo com as instruções do fabricante. Genericamente, a 5 µl de extrato de RNA total foram adicionados 1 µl de oligonucleótidos (hexâmeros) sintéticos iniciadores com sequências aleatórias e 6 µl de

água tratada com DEPC. A mistura foi incubada a 65°C durante 5 min. (desnaturação do RNA para eliminar as estruturas secundárias) sendo posteriormente mantida em gelo. Seguidamente, foram adicionados 4 µl da solução tampão de reação 5x, 1 µl inibidor de RNases (*RiboLock™ RNase Inhibitor*), 2 µl de dNTPs 10mM e 1 µl de transcriptase reversa (*RevertAid™ H Minus M-MuLV*, 200U/µl) perfazendo um volume total de 20 µl. A transcrição reversa foi efetuada num termociclador de acordo com o programa descrito na Tabela 2.1. Os produtos resultantes da transcrição reversa (cDNA) foram conservados a -20°C até serem utilizados.

**Tabela 2.1 – Condições utilizadas na reação de transcrição reversa a partir de RNA total.**

Etapa	Temperatura (°C)	Tempo (min)	Número de ciclos
Hibridação	25	5	1
Extensão	42	60	1
Inativação da enzima RT	70	15	1

## 2.3 Amplificação da sequência codificadora de E3 por PCR

Para a amplificação por PCR da sequência codificadora da proteína E3 do CHIKV usou-se o *kit* comercial *illustra™ puReTaq Ready-To-Go PCR Beads* (Amersham Biosciences, UK). Este consiste em esferas de reagentes liofilizados que, após reconstituição num volume final de 25 µl, originam misturas de reação com 2,5 U de DNA polimerase *puReTaq* em Tris-HCl 10 mM, KCl 50 mM, 200 µM e MgCl<sub>2</sub> 1,5 mM. Assim, cada esfera foi hidrolisada com 18 µl de água, 5 µl de cDNA e 1 µl de cada uma das sequências iniciadoras (*primers*) do par E3\_F/E3\_R (20 pmoles/µl) ou do par E3H\_F/E3H\_R (Tabela 2.2). As condições da PCR utilizadas foram as representadas na Tabela 2.3. As reações de PCR decorreram num termociclador *iCycler* (Bio-Rad, EUA).

**Tabela 2.2 – Oligonucleótidos iniciadores para amplificação da sequência codificadora de E3**

Oligonucleótido	Sequência (5'- 3')*	Posição no genoma de CHIKV (S27)
E3_F	GGTGGTTGCTCTT <u>CCA</u> CACTCTTGCCATCCCAGTTATG	8350-8370
E3_R	GGTGGTCTGCAGTCAGCTGCGTCGCTGGCGGTG	8526-8544
E3H_F	CTCTTCCATGGGTCTTGCCATCCCAGTTATGTGCC	8350-8374
E3H_R	CTTGCTCGAGGCGACGCTGGCGGTGGGGAGAAC	8519-8541

\*A sequência de nucleótidos codificadora de E3 ou o seu complemento está representada a negrito. Os nucleótidos sublinhados correspondem a locais de restrição introduzidos nas sequências iniciadoras. Em itálico está a sequência complementar do códon de terminação da tradução.

**Tabela 2.3 – Condições utilizadas para amplificação por PCR do fragmento de DNA correspondente à proteína E3.**

	Temperatura (°C) E3_F/E3_R	Temperatura (°C) E3H_F/E3H_R	Tempo	Número de ciclos
Desnaturação inicial	94	94	2 min	1
Desnaturação	94	94	30 seg	5
Hibridação	55	58	30 seg	
Extensão	72	72	30 seg	
Desnaturação	94	94	30 seg	35
Hibridação	62	65	30 seg	
Extensão	72	72	30 seg	
Extensão final	72	72	5 min	1

Os produtos amplificados foram misturados com tampão de aplicação e separados por eletroforese em gel de agarose a 2% em solução tampão TAE 0,5x (**anexo 1**), com 0,5 µg/ml de brometo de etídeo. O tamanho foi estimado a partir da migração relativa de um marcador de massa molecular (*GeneRuler™ 100 pb Plus DNA Ladder*, Fermentas,



Lituânia). Utilizou-se o sistema *Gel Doc XR System* (Bio-Rad, EUA) para a visualização e registo em suporte digital de imagem, sob luz UV, dos produtos amplificados.

## 2.4 Purificação dos Produtos de PCR

Para a purificação dos produtos de PCR foi utilizado o kit *Wizard®SV gel and PCR Clean-Up System* (Promega, USA) de acordo com as instruções do fabricante. Resumidamente, a 40 µl de produto de PCR adicionou-se igual volume de “solução de ligação à membrana” e transferiu-se a mistura para uma coluna de purificação. Após 1 min. à temperatura ambiente, centrifugou-se 1 min. a 16000 xg e rejeitou-se o *flowthrough*. Seguiram-se dois passos de lavagem com 700 e 500 µl de “solução de lavagem da membrana” com rejeição do *flowthrough* após centrifugação 16000 xg. O DNA foi eluído através da adição de 30 µl de água sem RNases, incubação 1 min. à temperatura ambiente e centrifugação 1 min. a 16000 xg.

## 2.5 Digestão com enzimas de restrição

A digestão com as diferentes enzimas de restrição seguiu, essencialmente, as instruções dos respetivos fabricantes. O produto de PCR obtido com as sequências iniciadoras E3\_F/E3\_R e o plasmídeo pTYB21 (IMPACT™ kit, New England Biolabs, EUA; **anexo 2**) foram sujeitos, individualmente, a dupla digestão com as enzimas FastDigest® SapI e FastDigest® PstI (Fermentas, Lituânia). Aproximadamente 1 µg de DNA foi digerido com 1 µl de cada enzima em tampão FastDigest 1X, num volume de reação 20 µl e 30 µl para o plasmídeo e produto de PCR, respetivamente, a 37°C, 5 min.

O produto de PCR obtido com as sequências iniciadoras E3H\_F/E3H\_R e o plasmídeo pET-28b(+) (Novagen, EUA; **anexo 2**), foram duplamente digeridos com as enzimas XhoI e NcoI (Fermentas, Lituânia), 15 U de cada em tampão TANGO 2X, durante 2 h a 37°C.

## 2.6 Clonagem da sequência codificadora de E3 em vetores plasmídicos

### 2.6.1 Ligação

Para a ligação do fragmento de DNA codificador da proteína E3 aos plasmídeos de expressão pTYB21 e pET-28b(+), os produtos de PCR e plasmídeos, digeridos com as enzimas de restrição adequadas, foram purificados como descrito em 2.4 e ligados usando o *Quick Ligation™ kit* (New England Biolabs, USA). Resumidamente, combinaram-se 50 ng de plasmídeo vetor e 4,5 ng e 6 ng de produto de PCR, respetivamente para as misturas de ligação com pTYB21 e pET-28b(+), para uma proporção molar de inserto:vetor de 3:1. A reação decorreu em 20 µl de tampão de ligação 1X, a que se adicionou 1 µl de Quick T4 DNA ligase, durante 5 min. à temperatura ambiente.

### 2.6.2 Preparação de bactérias competentes e transformação por choque térmico

Para a obtenção de clones recombinantes da construção pretendida transformaram-se bactérias competentes *E.coli* estirpe JM109. Para a preparação de células competentes, uma ansada de cultura JM109, congelada a -80°C em glicerol, foi inoculada em 3 ml de meio LB líquido (**anexo 1**) e crescida com agitação a 220 rpm, 37°C, durante a noite. No dia seguinte, 200 µl da cultura foram inoculados em 20 ml de LB e o crescimento celular decorreu nas mesmas condições até a cultura atingir uma DO<sub>600nm</sub> de 0,3-0,5. A cultura foi então centrifugada a 3300 xg, 4°C, 10 min., o sobrenadante decantado e o sedimento de bactérias ressuspenso em 1 ml de TSS frio (**anexo1**). A 100 µl de bactérias competentes foram adicionados 2 µl da mistura de ligação de 2.6.1 e a mistura mantida em gelo durante 30 min. As células foram então submetidas a um choque térmico durante 1,5 min. a 42°C e, de seguida, transferidas para gelo. Após 5-10 min., 900 µl de meio LB à temperatura ambiente foram adicionados e a suspensão incubada com agitação suave, 1h, a 37°C.

Placas preparadas com meio LB sólido (**anexo 1**) seletivo suplementado com ampicilina (100 µg/ml) ou com canamicina (35 µg/ml), respetivamente para a clonagem em pTYB21 ou em pET28b(+), foram inoculadas com 100 µl desta suspensão bacteriana.

Os restantes 900 µl foram centrifugados, decantado o sobrenadante, e o sedimento ressuspense no meio residual (~100 µl) e semeado. As placas foram incubadas a 37°C durante a noite. Foi feito o mesmo procedimento para o plasmídeo religado (sem o inserto), de modo a servir posteriormente como controlo negativo.

A transformação de estirpes bacterianas para expressão, ER2566 (New England Biolabs; **anexo 2**) e Origami (Merck; **anexo 2**) no caso de pTYB21 recombinante ou de Rosetta pLysS e BL21 pLysS (Novagen; **anexo 2**) no caso de pET28b(+) recombinante, foi feita essencialmente como descrito no parágrafo anterior com as alterações que se seguem: i) as estirpes Rosetta e BL21 de *E. coli* foram crescidas em meio LB suplementado com cloranfenicol (34 µg/ml); ii) o período de incubação em gelo, anterior ao choque térmico, das bactérias a transformar e plasmídeo recombinante foi prolongado para 1h com agitação com vortex cada 15 min; iii) após choque térmico a recuperação foi feita em meio SOC líquido (**anexo1**) no caso das estirpes Rosetta e BL21.

### **2.6.3 Detecção de clones bacterianos transformados com plasmídeos recombinantes**

Colónias isoladas, resultantes do crescimento durante a noite em meio seletivo, foram repicadas para 2 ml de meio líquido contendo o antibiótico adequado e crescidas durante a noite, a 37°C, com agitação a 220 rpm. No dia seguinte, procedeu-se à extração de DNA plasmídico segundo a técnica de lise alcalina. Brevemente, as culturas foram transferidas para tubos Eppendorf de 2 ml, centrifugadas 1 min. a 13000 xg e o sedimento ressuspense em 300 µl de TE + 100 µg/ml de RNase (**anexo 1**). Em seguida adicionou-se 300 µl de solução de lise (NaOH 0,2M, 1% SDS), misturou-se por inversão e, após 5 min. à t.a., adicionou-se 300 µl de solução de neutralização (KOAc 3M, pH 5,5) que se misturou por inversão. Seguiu-se centrifugação a 13000 xg, 15 min., transferência do sobrenadante para novo tubo Eppendorf, adição de 630 µl de isopropanol (0,7 vol), mistura e centrifugação 30 min. à t.a., a 13000 xg. O sedimento foi lavado com 500 µl de etanol a 70%, seco e ressuspense em 30 µl de H<sub>2</sub>O.

A identificação de plasmídeos recombinantes tendo ligado o inserto com o tamanho correto foi feita por digestão de 2 µl de DNA plasmídico com as enzimas de restrição BglII e PstI, no caso da clonagem em pTYB21, ou com XhoI e EcoRV, no caso da

clonagem em pET-28b(+). Seguiu-se essencialmente o protocolo recomendado pelo fabricante e descrito na secção 2.5. A análise dos produtos de digestão fez-se por eletroforese em gel de agarose (secção 2.3), comparando o padrão de migração com o de marcadores de massa molecular e do respetivo plasmídeo selvagem. Os plasmídeos recombinantes com o inserto do tamanho adequado foram purificados usando o sistema *DNA Clean & Concentrator*<sup>TM</sup>-5 (Zymo Research, EUA) seguindo as instruções do fabricante e enviados para sequenciação (StabVida, Portugal) para confirmar a ligação correta do fragmento. Na sequenciação dos clones recombinantes dos dois vetores usou-se o *primer T7 Terminator Reverse*. A confirmação da transformação das estirpes de expressão com os plasmídeos recombinantes foi feita por PCR e consistiu na amplificação da sequência codificadora da proteína E3, diretamente a partir de 2 µl de cultura bacteriana em meio líquido, seguindo o protocolo descrito na secção 2.3.

## **2.7 Expressão da proteína de fusão CBD-inteína-E3**

Para identificar clones bacterianos capazes de expressar a proteína de fusão CBD-inteína-E3, uma colónia de ER2566 transformada com um plasmídeo pTY21B recombinante foi crescida em 4 ml de LB com ampicilina, a 37°C, até atingir a  $DO_{600nm} \sim 0,5$ . Retirou-se 2 ml de cultura para outro tubo (cultura não induzida) e ao restante (cultura induzida) foi adicionado IPTG para uma concentração final de 0,1 mM. Após incubação durante 2h a 37°C, retirou-se 40 µl da cultura induzida e da não induzida, adicionou-se 20 µl de tampão de aplicação 3X (**anexo 1**) para posterior análise das proteínas por SDS-PAGE (secção 2.11).

## **2.8 Purificação da proteína de fusão CBD-inteína-E3**

Para a purificação da proteína de fusão CBD-inteína-E3, 15 ml de uma cultura de células ER2566 transformadas com um plasmídeo pTY21B recombinante foram centrifugados a 3300 xg, 10 min., 4°C, e o sedimento ressuspenso em 4 ml de tampão de lise (20 mM Tris-HCl pH 8,5, NaCl 0,5 M, EDTA 1 mM, 0,1% Triton X-100, PMSF 20 µM) ou da solução de lise comercial B-PER (Thermo Scientific, USA). Após 5 pulsos

de sonicação durante 1 min. com 30 seg. de pausa, mantendo o tubo em gelo, a suspensão foi centrifugada a 16000 xg, durante 30 min., a 4°C, e colhido o sobrenadante (lisado clarificado).

O lisado clarificado foi aplicado com o auxílio de uma bomba peristáltica (0,5 ml/min) numa coluna de quitina, previamente equilibrada por lavagem com 10 volumes (25 ml) de tampão da coluna (Tris-HCl 20 mM pH 8,5, NaCl 0,5 M). Colheu-se o *flowthrough* e guardou-se 50 µl para posterior análise. O *flowthrough* colhido foi novamente passado na coluna, após o que uma amostra de resina foi removida para análise.

A coluna foi então lavada com 30 volumes (75 ml) de tampão de coluna à velocidade de 2 ml/min. Várias frações dessa lavagem foram colhidas, assim como uma amostra de resina após completada a lavagem.

A “clivagem”, *i.e.* separação de E3 por ação da inteína, foi induzida com 3 volumes de tampão de clivagem (Tris-HCl 20 mM pH 8,5, NaCl 1M, cisteína 50 mM, 0,1 mM EDTA, 0,1% Triton X-100), seguido de incubação durante 48h à temperatura ambiente. Prosseguiu-se para a eluição da proteína com 2 volumes de tampão da coluna colhendo-se frações de 0,7 ml, assim como uma amostra da resina após a eluição.

Por fim, procedeu-se à eliminação de qualquer material ligado à coluna (*stripping*) pela adição de 3 volumes de uma solução de 1% SDS, incubação 30 min, passagem através da coluna de mais 7 volumes de 1% SDS, seguido de 20 volumes de H<sub>2</sub>O e 5 volumes de tampão da coluna. Uma última amostra de resina foi colhida para confirmação da presença de vestígios de proteína.

Alíquotas do material colhido nas diferentes fases do processo foram misturadas com tampão de aplicação 3X para análise das proteínas por SDS-PAGE.

## **2.9 Expressão da proteína de fusão E3-[His]<sub>6</sub>**

Após confirmação por PCR da presença de pET28b(+) recombinante (secção 2.3), uma colónia transformante isolada foi crescida em LB suplementado com canamicina (15 µg/ml) e cloranfenicol (34 µg/ml), a 37°C, até atingir uma DO<sub>600nm</sub> ~0,5. Retirou-se 2 ml de cultura para outro tubo (cultura não induzida) e a restante foi induzida com IPTG 1 mM, durante 4h a 37°C. Retirou-se 40 µl de cultura induzida e não induzida para um

eppendorf e adicionou-se tampão de aplicação 3X para posterior análise eletroforética das proteínas por SDS-PAGE.

## 2.10 Purificação da proteína de fusão E3-[His]<sub>6</sub>

Para a purificação da proteína de fusão E3-[His]<sub>6</sub>, usou-se inicialmente o sistema comercial *Ni-NTA Spin Kit* (QIAGEN, Alemanha), seguindo essencialmente as instruções do fabricante para condições desnaturantes. As condições nativas foram semelhantes mas omitindo ureia 8 M dos tampões de ligação, lavagem e eluição.

A cultura de bactérias do passo anterior, sujeita a indução da expressão da proteína E3-[His]<sub>6</sub>, foi centrifugada e o sedimento ressuspense em 400 µl de tampão de lise (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 100 mM, Tris-HCl 10 mM, ureia 8M, pH 6,3). Em seguida, o lisado foi centrifugado durante 20 min. a 15000 xg e transferido o sobrenadante para um novo tubo eppendorf.

O sobrenadante obtido foi aplicado numa coluna de níquel (Ni-NTA) previamente equilibrada com 600 µl de tampão de lise, seguindo-se centrifugação 2 min. a 700 xg. Após lavagem da coluna 2 vezes, *i.e.* adição de 600 µl de tampão de lavagem e centrifugação durante 2 min. a 700 xg, a proteína foi eluída com 200 µl de tampão de eluição (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 100 mM, Tris-HCl 10 mM, ureia 8 M, pH 5,9) e centrifugação durante 2 min. 700 xg, repetindo-se novamente este passo para uma eluição completa.

Em alternativa, foi seguido o protocolo para condições desnaturantes do sistema comercial *His SpinTrap* (Amersham, UK). O sedimento resultante de 20 ml de cultura bacteriana induzida foi ressuspense em 1,4 ml de tampão de ligação (Tris-HCl 20 mM, ureia 8 M, NaCl 500 mM, imidazol 5 mM, 1 mM β-mercaptoetanol, pH 8,0), seguindo-se a lise das células através da adição de lisosima (0,2 mg/ml), DNase (20 µg/ml), de MgCl<sub>2</sub> (1 mM) e PMSF (1 mM). Agitou-se suavemente com vórtex, incubou-se à t.a durante 30 min. e centrifugou-se durante 10 min. a 13600 xg para remover o material insolúvel. O sobrenadante, *i.e.* lisado clarificado, foi então usado para purificação de E3-[His]<sub>6</sub> numa coluna de *Ni-Sepharose* (Amersham, UK) pré-equilibrada em 600 µl de tampão de ligação (Tris-HCl 20 mM, ureia 8 M, NaCl 500 mM, imidazole 5 mM, pH8,

$\beta$ -mercaptoetanol 0, 1mM + 1% Triton X-100). Aplicou-se o lisado clarificado na coluna e centrifugou-se a baixa velocidade (100 xg), 30 seg. Após duas lavagens da coluna com tampão de ligação e centrifugação a baixa velocidade, procedeu-se à eluição, em dois passos sucessivos, adicionando 200  $\mu$ l de tampão de eluição (Tris-HCl 20 mM, ureia 8 M, NaCl 500 mM, imidazole 500 mM, pH 8,0, 1 mM  $\beta$ -mercaptoetanol, 1% Triton X-100), seguido de centrifugação 30 seg. a 100 xg.

## 2.11 SDS-PAGE

Na separação das proteínas das diferentes amostras usou-se o método de tricina-SDS-PAGE, essencialmente como descrito por Haider SR *et al.* 2010, utilizando o sistema *Mini-Protean® 3 Cell* (Bio-Rad, EUA).

O gel de resolução consistiu numa solução de 9% ou 15% de acrilamida (*Acrylamide/Bis Solution* 29:1, Bio-Rad, EUA), Tris-HCl 1,15 M pH 8,8, 0,05% persulfato de amónio (APS), 0,05% TEMED. O gel de concentração consistiu em 4% de acrilamida, Tris-HCl 0,38 M pH 8,8, 0,05% APS/0,1% TEMED). Como eletrólito usou-se uma solução de 25 mM Tris-tricina (G Bioscience, EUA), 0,05% SDS. O gel de concentração foi corrido a 50 V até as amostras entrarem no gel de resolução, aumentando-se subsequentemente a voltagem para 100 V durante aproximadamente 1h. Marcadores de massa molecular foram corridos em paralelo com as amostras. Foram usados os marcadores ProSieve® Color Protein Markers (M.w.9kDa-170kDa) e (M.w.10kDa-175kDa), Amersham Color Marker (M.w.14,4kDa-94kDa), Sigma Color marker Ultra Low range (M.w.1,060-26,600), PRO-STAIN™ Prestained Protein Marker (M.w.9kDa-198kDa). Para visualização das proteínas, os géis foram corados com uma solução de 0,125% de Azul Coomassie R-250 (BioRad, EUA) em 50% de metanol e 10% de ácido acético e descorados com uma solução aquosa de 20% de metanol e 20% de ácido acético. Como alternativa os géis foram corados com uma solução comercial de Azul Coomassie (*Bio-Safe™Coomassie*, BioRad, EUA) e descorados com água.

## 2.12 Detecção de proteínas por *Western-blot*

Para a identificação da proteína recombinante de fusão com inteína utilizou-se a técnica de *Western-blot*. Resumidamente, o procedimento consiste na transferência de proteínas separadas num gel de SDS-PAGE para uma membrana, bloqueio da membrana, incubação com anticorpos (primário e secundário) e detecção dos complexos antigénio-anticorpo.

### 2.12.1 Transferência de proteínas para a membrana de nitrocelulose

A transferência das proteínas do gel de acrilamida para a membrana de nitrocelulose (*Nitrocellulose Hybond<sup>TM</sup>ECL<sup>TM</sup>*, Amersham Pharmacia Biotech, Reino Unido) foi efetuada no sistema semi-seco *Trans-Cell Blot* (Bio-Rad, EUA). O gel equilibrado em tampão de transferência Towbin (**anexo 1**) e a membrana hidratada em água foram colocados entre folhas de papel Whatman 3MM embebidas em tampão Towbin, com a membrana no lado proximal do ânodo e o gel no lado proximal do cátodo. A transferência decorreu durante 2 horas a 40V. Após a transferência, a presença de proteínas na membrana de nitrocelulose foi verificada por coloração rápida (~5 min) com *Rouge Ponceau* (**anexo 1**), seguida de eliminação do excesso de corante por lavagem com NaOH 0,1M e água destilada.

### 2.12.2 Bloqueio e incubação com anticorpos

Para limitar a ligação inespecífica dos anticorpos à membrana de nitrocelulose esta foi incubada a 4°C durante a noite em tampão de bloqueio (**anexo 1**). Em seguida, para detecção da expressão da proteína de fusão CBD-inteína-E3, a membrana foi incubada com anticorpo primário, *i.e.* soro policlonal de coelho anti-domínio de ligação à quitina (*IMPACT<sup>TM</sup> kit*, New England Biolabs, EUA) diluído a 1:5000 em tampão de bloqueio, com agitação suave, durante 1h, à t.a. Decantou-se a solução contendo o anticorpo primário e a membrana foi lavada 3X durante 10 min. com TBST (**anexo 1**). Seguiu-se a incubação com o anticorpo secundário, *i.e.* anticorpo anti-IgG de coelho, produzido



em cabra, conjugado com peroxidase (A0545, Sigma-Aldrich, EUA) diluído a 1:160000 em tampão de bloqueio, com agitação suave, durante 1h, à t.a. Decantou-se a solução contendo o anticorpo secundário e a membrana foi lavada 3X durante 10 min. com TBST.

A detecção dos anticorpos ligados às proteínas imobilizadas na membrana foi efetuada através de uma reação colorimétrica da peroxidase presente no conjugado. Utilizou-se o sistema comercial *SIGMAFAST<sup>TM</sup> DAB With Metal Enhancer* (Sigma-Aldrich, EUA), sendo a membrana incubada com uma solução 3,3'-diaminobenzidina (0,5 m/ml), CoCl (0,2 mg/ml), H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0,3 mg/ml) NaCl 0,15M, Tris-HCl 0,05M seguindo as instruções do fabricante.

### 3. Resultados

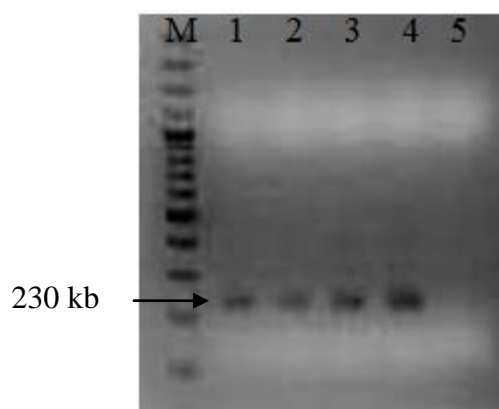
#### 3.1 Clonagem da sequência codificadora da proteína E3 de CHIKV no vetor de expressão pTYB21

Para a expressão da proteína E3 em *E. coli* procedeu-se à clonagem da sua sequência codificadora no vetor de expressão pTYB21 do sistema IMPACT (New England Biolabs) a jusante e na mesma grelha de leitura aberta da sequência codificadora da inteína Sce VMA1. Esta, por sua vez, está fundida no extremo 5' com um domínio de ligação à quitina e o conjunto é expresso sob o comando do promotor T7. pTYB21 possui uma marca de resistência à ampicilina.

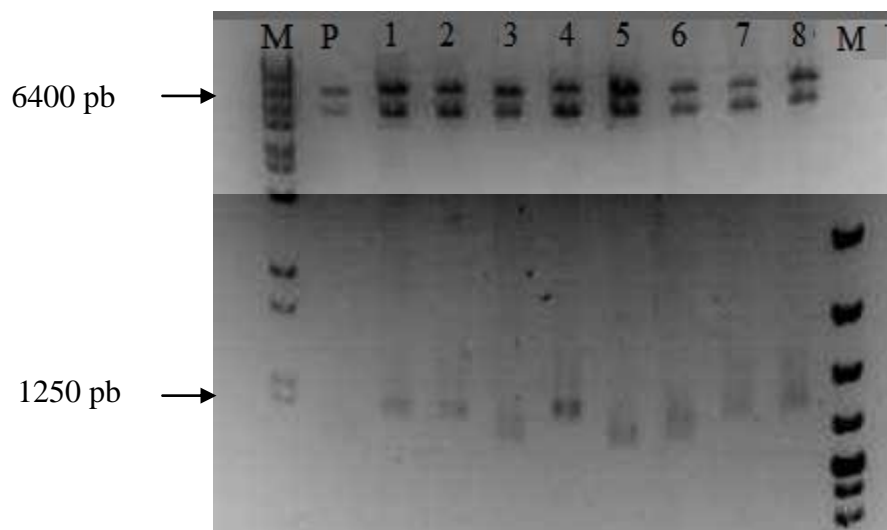
Para a clonagem no vetor pTYB21, a sequência codificadora da proteína E3 de CHIKV foi amplificada por RT-PCR a partir de RNA viral extraído do sobrenadante de culturas de células Vero infetadas com o vírus. As sequências iniciadoras (*primers*) usadas na amplificação foram desenhadas de forma a introduzirem locais de restrição adequados à clonagem dirigida em pTYB21, pelo que os *primers forward* e *reverse* (E3\_F e E3\_R) possuem locais de reconhecimento pelas enzimas SapI e PstI, respetivamente (Tabela 2.2, **anexo 2**). Ainda, o codão do primeiro aminoácido da proteína E3 foi alterado para codificar um resíduo de treonina em lugar da serina presente na sequência nativa (AGT→ACT). A introdução desta mutação teve por objetivo assegurar uma boa eficiência de clivagem da proteína E3 pela inteína. Foi também introduzido um codão de terminação da tradução (UGA) no *primer reverse*, uma vez que E3 faz parte de uma poliproteína e, naturalmente, a sequência codificadora não tem este codão. As condições de PCR usadas permitiram a amplificação específica de um fragmento de DNA com aproximadamente 230 pb (Fig. 3.1), concordante com o tamanho estimado com base na sequência descrita para a proteína E3 do CHIKV e nos *primers* empregues. Após digestão de restrição com SapI e PstI, o produto amplificado foi purificado, ligado a pTYB21, previamente digerido com as mesmas enzimas, e a mistura de ligação usada para transformar *E. coli* JM109. Depois da seleção em meio com ampicilina, a identificação de clones transformantes tendo a construção pTYB21 recombinante esperada foi feita por digestão com as enzimas de restrição BglII e PstI. A não utilização da enzima de restrição SapI no rastreio de recombinantes deve-se ao facto do

local SapI não ser restabelecido quando da ligação. Na Fig. 3.2 está apresentado o padrão da dupla digestão com aquelas enzimas para plasmídeos extraídos de oito colônias de *E. coli* JM109 transformantes e ainda para pTYB21 selvagem. Cinco destes plasmídeos (1, 2, 4, 7 e 8) apresentam produtos de digestão compatíveis com a integração de um inserto completo (~6400 pb + ~1250 pb vs ~6400 pb + ~1100 pb ). Os restantes poderão representar plasmídeos sem inserto ou com insertos de menores dimensões. Observa-se ainda digestão incompleta dos plasmídeos, revelada por uma banda com migração mais lenta que surge acima da banda do marcador correspondente a 7242 pb.

A sequenciação da região do inserto dos cinco plasmídeos considerados como tendo o inserto do tamanho esperado permitiu confirmar a ligação correta do fragmento da sequência codificadora de E3 ao vetor pTYB21, com inserção na mesma grelha de leitura da inteína. Na Fig. 3.3 estão apresentadas as sequências nucleotídica (A) e de aminoácidos deduzida (B) para um dos recombinantes (pTYB21-4). A utilização do local SapI para clonagem resulta na fusão do gene de E3 adjacente à inteína sem resíduos de aminoácidos extra. O primeiro codão de E3 sofreu a mutação (AGT →ACT; Ser→Thr) devido à alteração introduzida com o *primer* 5' para facilitar a clivagem posterior da proteína E3 pela inteína.



**Figura 3.1 - Amplificação da sequência codificadora da proteína E3 de CHIKV.** Migração dos produtos de RT-PCR em gel de 2% de agarose. Pista M – marcador de tamanhos moleculares, (*GeneRuler™ 100 pb Plus DNA Ladder*, Fermentas). Poços 1,2,3,4 - produtos de RT-PCR tendo como matriz RNA viral. Pista 5- controlo negativo de RT-PCR.



**Figura 3.2 – Análise de DNA plasmídico de clones transformantes de *E. coli* JM109 digerido com as enzimas de restrição *Pst*I e *Bgl*II.** M – marcador de tamanhos moleculares Lambda/BstEII (Fermentas); P – pTYB21; 1, 2, 4, 7 e 8 – recombinantes com o inserto de tamanho correto, 3, 5 e 6 - não recombinantes/deletantes, M- marcador de tamanhos moleculares *GeneRuler™ 100 pb Plus DNA Ladder*, Fermentas. Montagem de duas fotos do mesmo gel e à mesma escala mas com diferentes tempos de integração da imagem.

A.

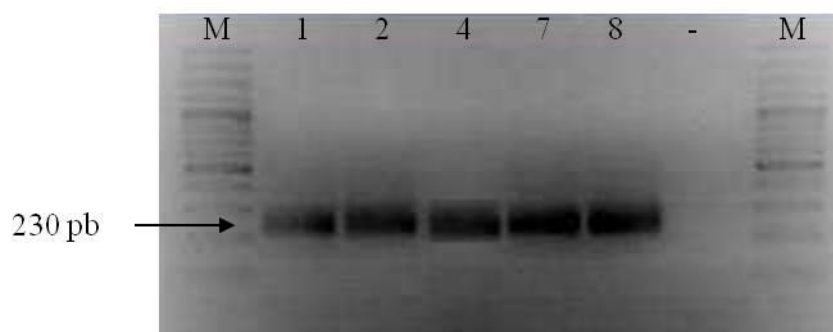
GTTGTACAGAACACTCTTGCCATCCCAGTTATGTGCCTGTTGGCAAATAC  
CACGTTCCCCTGCTCCCAGCCCCCTTGCATACCCTGCTGCTCCGAAAAG  
GAACCGGAGGAAACCCTACGCATGCTTGAGGACAACGTCATGAGACCT  
GGGTACTATCAGCTGCTACAAGCATCATTAACATGTTCTCCCCACCGCC  
AGCGACGCAGCTGA

B.

VVQNTLAIPVMCLLANTTFPCSQPPCIPCCSEKEPEETLRMLEDNVMRPGY  
YQLLQASLTCSPHRQRRS\*

**Figura 3.3 - Sequência de nucleótidos codificadora da proteína E3 de CHIKV presente na construção recombinante pTYB21-4 (A). Sequência de aminoácidos deduzida do inserto de pTYB21-4 (B).** As caixas cinzentas assinalam as sequências de nucleótidos e aminoácidos do extremo carboxilo da inteína.

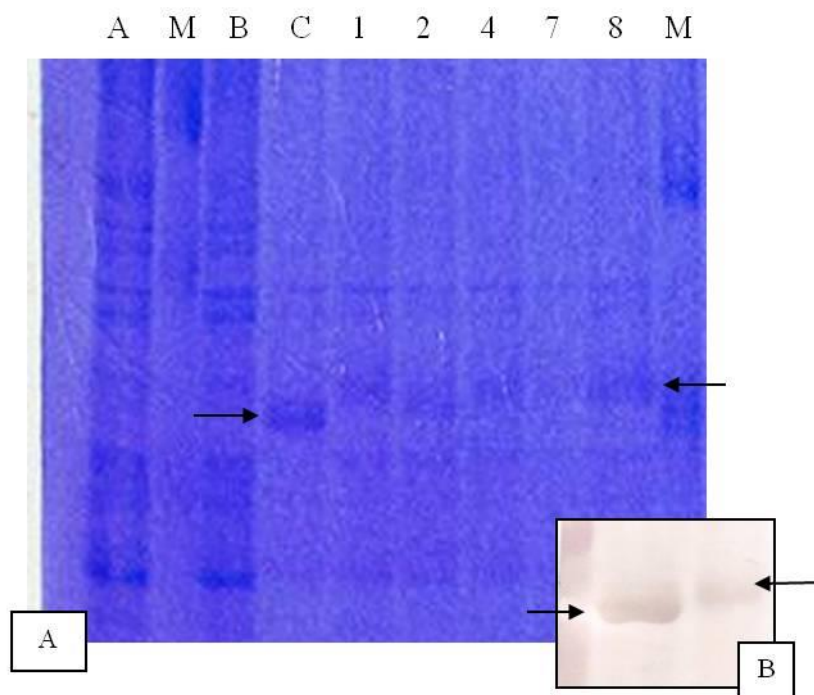
Após confirmação da construção correta por sequenciação, o DNA plasmídico das cinco construções recombinantes de pTYB21 foi usado para transformar a estirpe de expressão *E. coli* ER2566 incluída no kit IMPACT™ e recomendada pelo fabricante. Após seleção dos transformantes em meio com ampicilina, a presença da sequência codificadora de E3 foi verificada, diretamente em culturas de colónias individuais, por PCR com os *primers* usados na amplificação inicial a partir do cDNA (Fig. 3.4).



**Figura 3.4 – Amplificação por PCR da sequência codificadora de E3 em transformantes de *E. coli* ER2566.** Produtos de PCR separados em gel de agarose a 2%. M- marcador de tamanhos moleculares (*GeneRuler™ 100 pb Plus DNA Ladder*, Fermentas); 1, 2, 4, 7 e 8 – clones positivos e controlo negativo.

### 3.2 Expressão da proteína de fusão CBD-inteína-E3

Para analisar a expressão da proteína de fusão CBD-inteína-E3 nos cinco clones transformantes de *E. coli* ER2566 obtidos (pTYB21-1, -2, -4, -7 e -8), extratos totais de culturas cuja expressão da proteína de fusão foi induzida numa  $DO_{600nm}=0,5$  com IPTG 0,4 mM, durante 2h, a 37°C, foram separados em géis de SDS-PAGE juntamente com extratos de bactérias não transformadas e transformadas com pTYB21 selvagem. No extrato da cultura induzida correspondente ao transformante pTYB21 observou-se uma banda de aproximadamente 56 kDa correspondente à massa da proteína de fusão CBD-inteína, cuja expressão está sob o comando do promotor T7, e que não é observada na cultura correspondente não induzida, na cultura de células não transformadas ou nos clones dos transformantes analisados (Fig. 3.5). Nos extratos totais das culturas induzidas dos transformantes observa-se uma banda adicional com uma massa molecular de aproximadamente 60 kDa (pTYB21-2) e de 64 kDa nos restantes (pTYB21-1, -4, -7 e -8) (Fig. 3.5A). Esta última deverá corresponder à massa da proteína de fusão CBD-inteína-E3, uma vez que a massa molecular estimada para E3 sem modificações pós-tradução é de 7 kDa (57). A análise por *Western-blot* de extratos proteicos totais de bactérias transformadas com pTYB21 selvagem e transformadas com pTYB21-4 demonstrou a ligação do anticorpo policlonal anti-inteína àquelas duas espécies moleculares indicando tratar-se proteínas de fusão com inteína (Fig. 3.5B). Selecionou-se o clone pTYB21-4 para prosseguir com os estudos de expressão.

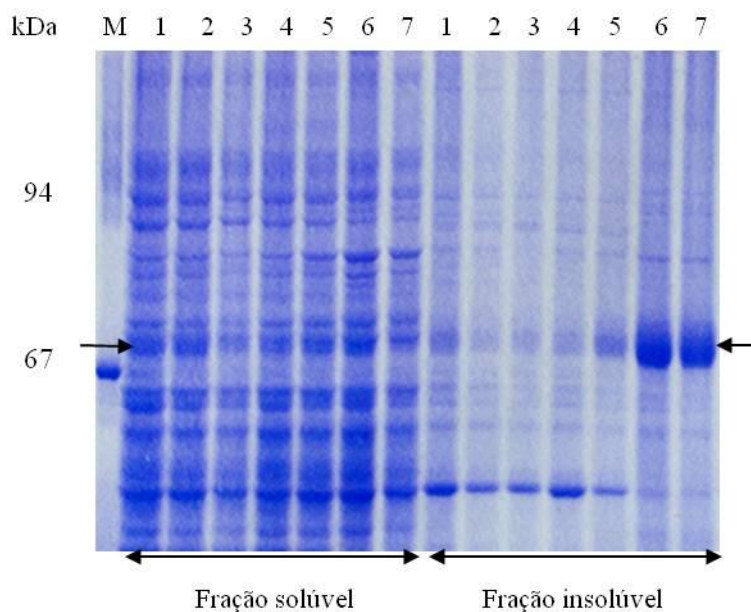


**Figura 3.5 – A) Expressão da proteína de fusão CBD-inteína-E3.** Gel de poliacrilamida SDS-PAGE corado com azul Coomassie. A- células ER2566, M- Marcador de massas moleculares (14,4kDa - 94kDa) , B- pTYB21 Wt controlo negativo, C- pTYB21 Wt controlo positivo, 1, 2, 4, 7, 8 - clones transformantes. As setas indicam as bandas correspondente à proteína de fusão CBD-inteína e CBD-inteína-E3. **B) Expressão da proteína de fusão CBD-inteína-E3. Western-blot.**

Curiosamente, a proteína de fusão CBD-inteína é aparentemente sintetizada em maior abundância relativamente à proteína de fusão CBD-inteína-E3. Numa tentativa de aumentar a produção desta proteína de fusão, foram testados vários parâmetros que na literatura são frequentemente associados à eficiência da expressão de proteínas recombinantes em *E. coli*, designadamente a densidade ótica da cultura quando da indução da expressão, a temperatura a que decorre a expressão e a concentração do indutor da expressão. Assim, culturas que atingiram  $DO_{600nm}$  de 0,5 e 0,8 foram induzidas com concentrações de 0,1, 0,4 e 1 mM para IPTG e a expressão decorreu a 37°C, 30°C e 25°C durante 6h. A redução da temperatura para 30°C ou 25°C aumentou significativamente a produção da proteína de fusão. A variação da concentração de IPTG, assim como os valores da DO da cultura quando da indução, não teve

aparentemente qualquer efeito na quantidade de proteína produzida (dados não apresentados).

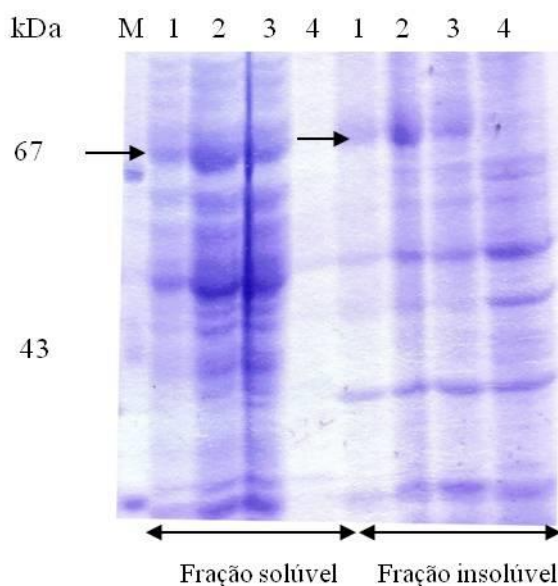
Um dos principais problemas associados à produção de proteínas recombinantes em *E. coli* é conseguir produzir a proteína de interesse na forma solúvel. Para avaliarmos a solubilidade de CBD-inteína-E3 produzida na estirpe ER2566, procedeu-se à indução da expressão nas condições atrás referidas mas testando apenas as temperaturas de indução de 25°C e 30°C. Findo o período de expressão, as células foram sedimentadas, ressuspensas em tampão de lise e lisadas por sonicação em gelo. O lisado obtido foi clarificado por centrifugação e os extratos proteicos do sedimento (fração insolúvel) e do sobrenadante (fração solúvel) foram analisados por SDS-PAGE. Observou-se que a proteína de fusão permanecia essencialmente associada à fração insolúvel, nomeadamente para as concentrações 0,4 e 1 mM de IPTG e temperatura de 30°C, independentemente do valor da DO da cultura quando da indução.



**Figura 3.6 – Solubilidade da proteína CBD-inteína-E3 após indução da expressão a diferentes temperaturas e diferentes concentrações de IPTG (mM).** Gel de poliacrilimida a 9%. M- marcador de massas moleculares ( 14,4kDa - 94kDa), 1- 0,01mM , 2- 0,1mM, 3- 0,4mM (Indução a 12°C), 4- 0,01mM, 5- 0,05mM (Indução a 30°C), 6- 0,01mM, 7-0,05mM (Indução a 37°C).

Assim, numa tentativa de aumentar a solubilidade da proteína de fusão testou-se o efeito de concentrações mais baixas de IPTG (0,01 e 0,05 mM) para temperaturas de indução

de 30°C e 37°C e de 0,01, 0,1 e 0,4 mM para uma temperatura de indução mais baixa (12°C), durante 3h. A maior quantidade de proteína produzida observou-se a 37°C, porém praticamente toda sob a forma insolúvel (Fig. 3.6). Uma vez que um período de indução de 3h a 12°C nos pareceu manifestamente insuficiente para a expressão da proteína de fusão, procedemos à indução da expressão com IPTG 0,1 mM durante 16h, a 12°C, e testámos igualmente a influência da DO<sub>600nm</sub> (0,8, 1,6 e 2,3) da cultura quando da indução nestas condições. Observou-se um aumento significativo da produção da proteína de fusão com o acréscimo do período de indução (16 h vs 3 h) para uma DO de 1,6, observando-se um aumento significativo da quantidade da forma solúvel que ultrapassou a da forma insolúvel (Fig. 3.7).

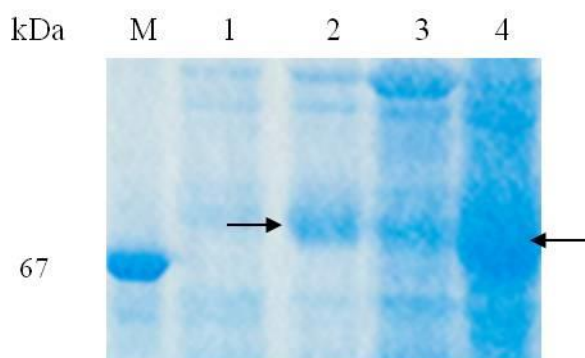


**Figura 3.7 – Solubilidade da proteína CBD-inteína-E3 após indução da expressão com 0,1mM de IPTG a diferentes densidades óticas, a 12°C, durante a noite.** Gel de gradiente de poliacrilamida 8%-12%. M- marcador de massas moleculares (14,4kDa - 94kDa), 1- DO<sub>600</sub>=0,8; 2- DO<sub>600</sub>=1,6; 3- DO<sub>600</sub>=2,3; 4-ER2566 (controlo negativo).

Uma vez que a solubilidade das proteínas heterólogas produzidas em *E. coli* pode estar relacionada com a sua incapacidade para assumir a conformação nativa, nomeadamente devido ao ambiente intracelular pouco propício ao estabelecimento de pontes dissulfureto e uma vez que E3 do CHIKV possui 6 resíduos de cisteína, procurámos avaliar a solubilidade da proteína de fusão produzida na estirpe *E. coli* Origami. Esta é um duplo mutante para os genes da redutase de tio-redoxina (*trxB*<sup>-</sup>) e da redutase da



glutathiona (*gor*<sup>-</sup>) que favorece a formação de pontes dissulfureto nas proteínas sintetizadas. Para tal, transformámos *E. coli* Origami com o vetor recombinante pTYB21-4, seleccionámos um clone transformante e analisámos a expressão da proteína de fusão numa cultura bacteriana ( $DO_{600nm}=0,8$ ) induzida com IPTG 1 mM, a 37°C, durante 24h. A proteína de fusão produzida nestas condições em *E. coli* Origami continuou a ser sintetizada maioritariamente sob a forma insolúvel (Fig. 3.8). Assim, como material de partida para a purificação de E3 em colunas de quitina (secção 3.3), optámos por produzir a proteína de fusão CBD-inteína-E3 em *E. coli* ER2566, clone pTYB21-4, fazendo indução de uma cultura na fase de planalto ( $DO_{600nm}=1,6$ ) com IPTG 0,1 mM, a 12°C, durante 16h.

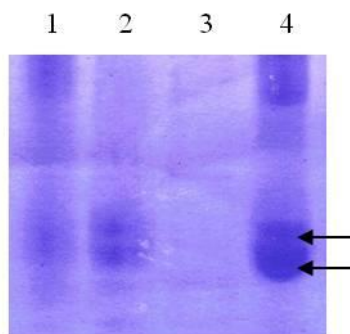


**Figura 3.8 – Solubilidade da proteína CBD-inteína-E3 expressa em transformantes de células Origami após indução a  $DO_{600}=0,6$ , 1mM de IPTG durante 24h a 37°C.** Gel de gradiente de poliacrilamida 8%-12%. M- marcador de massas moleculares, 1- clone transformante não induzido, 2- clone transformante induzido, 3- fração solúvel, 4- fração insolúvel.

### 3.3 Purificação de E3

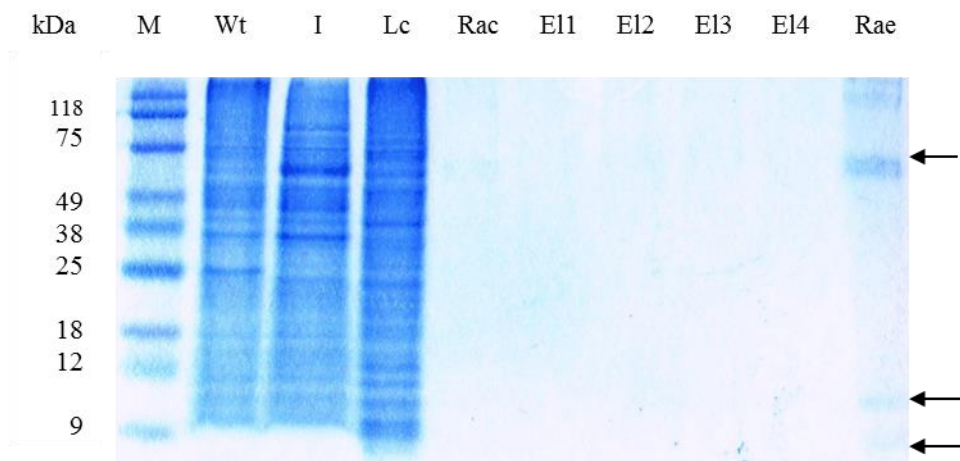
A fração solúvel de lisados de *E. coli* ER2566 clone pTYB21-4, contendo a proteína de fusão CBD-inteína-E3, foi aplicada numa coluna de afinidade constituída por esferas de quitina compactadas (IMPACT™, New England Biolabs) para retenção da proteína de fusão CBD-inteína-E3, subsequente clivagem de E3 na coluna, induzida por cisteína, e eluição de E3 livre. A análise por SDS-PAGE de amostras colhidas durante as várias fases do processo não permitiu detetar eluição da proteína E3 nas várias frações colhidas e demonstrou a retenção na coluna de duas espécies moleculares mal separadas

(56 kDa - 64 kDa) compatíveis com as fusões CBD-inteína e CBD-inteína-E3 antes e após clivagem e após o processo de eluição (Fig. 3.9). Este facto, sugestivo de clivagem incompleta de E3, levou à alteração das condições de clivagem. O aumento do tempo de clivagem para 72, 96 ou 120 horas não permitiu detetar eluição de E3 e continuou-se a observar a mesma dupla banda associada à resina findos aqueles tempos.



**Figura 3.9 – Purificação da proteína E3 em coluna de quitina.** Gel tris-tricina, 9% SDS-poliacrilamida. 1- resina antes da clivagem, 2- resina após clivagem, 3- eluato, 4- resina após eluição. As setas indicam a dupla banda de 56 e 64 kDa.

A utilização de cisteína para induzir a clivagem é sugerida pelo fabricante (IMPACT™, New England Biolabs) para proteínas com resíduos de cisteína, como acontece com E3. No entanto para a construção de fusão usada, *i.e* com a inteína Sce VMA1, a indução com DTT é normalmente recomendada. Assim testámos igualmente DTT, nas concentrações de 10 mM e 50 mM, mas aparentemente sem aumentar a eficiência da clivagem uma vez que continuámos sem conseguir detetar a eluição de E3 e a dupla banda se mantém. No entanto, na amostra de resina após eluição surgiram, para além de uma dupla banda de 56-64 kDa, duas bandas correspondendo a massas moleculares de 7 kDa e 11 kDa, a primeira podendo corresponder a E3. Se assim for, apesar da clivagem parecer ter ocorrido, E3 permanece associada à resina (Figura 3.10) não tendo sido possível o seu isolamento como espécie molecular única na forma solúvel eluída da coluna. A utilização de um detergente não iónico (0,1% de Triton X-100) e de uma concentração salina elevada (NaCl 1M) recomendada pelo fabricante não alterou esta situação.



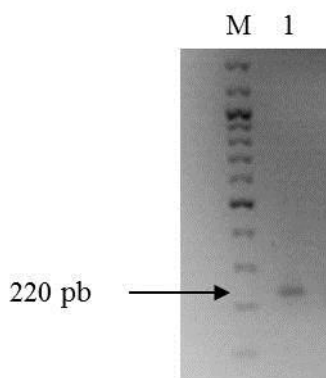
**Figura 3.10 – Purificação da proteína E3 em coluna de quitina.** Gel tris-tricina, 9% SDS-poliacrilamida. M – marcador de massas moleculares (9kDa - 170kDa), Wt- células ER2566, I- extrato total do clone induzido, Lc- lisado clarificado, Rac- resina após clivagem, El1-4- frações do eluato, Rae- resina após eluição. As setas indicam as espécies moleculares de 56-64, 11 e 7 kDa que permaneceram associadas à resina de quitina.

Face aos resultados obtidos com o protocolo IMPACT™, a alternativa seguida foi fazer clonagem de expressão no plasmídeo pET28b(+), o qual permite a fusão com caudas de hexa-histidinas para subsequente purificação em colunas de níquel, um processo muito frequentemente usado para expressão e purificação de proteínas recombinantes.

### 3.4 Clonagem da sequência codificadora da proteína E3 de CHIKV no vetor de expressão pET28b(+)

Para a clonagem no vetor pET28b(+), a sequência codificadora da proteína E3 de CHIKV foi amplificada por RT-PCR a partir de RNA viral extraído do sobrenadante de culturas células infectadas com o vírus. As sequências iniciadoras usadas na amplificação foram desenhadas de forma a introduzirem locais de restrição adequados à clonagem dirigida em pET28b(+) a jusante do promotor T7, pelo que os *primers forward* e *reverse* (E3H\_F e E3H\_R) possuem locais de reconhecimento pelas enzimas NcoI e XhoI, respetivamente (Tabela 2.2). A sequência de reconhecimento pela enzima NcoI permite

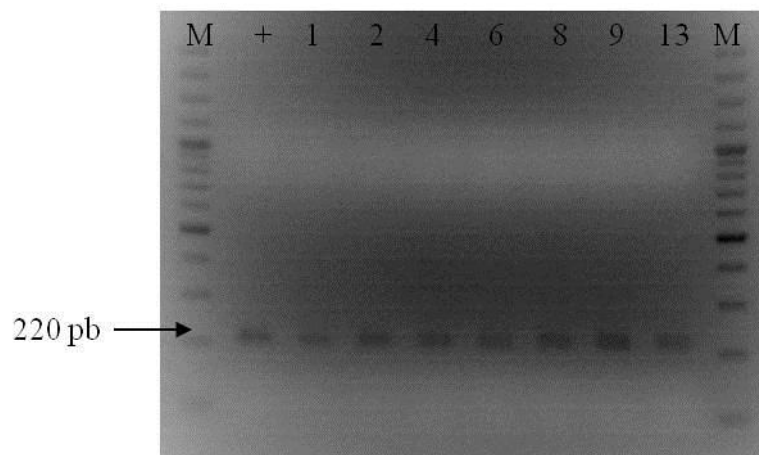
ainda introduzir um resíduo de metionina iniciador, útil na medida em que E3 é naturalmente sintetizada no contexto de uma poliproteína e o seu primeiro resíduo de aminoácido é serina. A sequência iniciadora 3', E3H\_R foi desenhada de forma que o corte com a enzima XhoI permitisse ligar o extremo 3' da sequência codificadora de E3 em grelha com a sequência codificadora dos seis resíduos de histidina de pET28b(+) (**anexo 2**). Ainda, quando da criação deste local de restrição, o codão codificador do resíduo Ser do extremo carboxilo de E3 foi substituído por um codão codificador de Glu e introduzido um codão para um resíduo Leu adicional que separa E3 da cauda de histidinas. A Fig. 3.11 mostra o resultado da amplificação específica por RT-PCR da sequência codificadora de E3 como um fragmento de aproximadamente 220 pb.



**Figura 3.11 – Amplificação da sequência codificadora de E3 por RT-PCR.** M – marcador de tamanhos moleculares (*Ladder* 100pb, Fermentas), 1 – produto de PCR.

Após amplificação, o produto de PCR foi digerido com as enzimas de restrição NcoI e XhoI, purificado e ligado ao plasmídeo pET28b(+) previamente digerido com as mesmas enzimas e purificado. A mistura de ligação foi usada para transformar células *E.coli* JM109. Os transformantes foram selecionados em meio com canamicina. Colónias isoladas foram crescidas em meio líquido e as preparações de plasmídeos, extraídos por lise alcalina, foram digeridas com XhoI e EcoRV para identificação de plasmídeos recombinantes. A utilização de EcoRV, em detrimento de NcoI, permitiu uma deteção mais económica dos recombinantes. Os plasmídeos com o inserto pretendido ligado deverão dar origem a dois fragmentos de 3954 pb e 1477 pb, enquanto pET28b(+) selvagem deverá dar fragmentos de aproximadamente 3954 pb e 1277 pb. Vários clones, tendo plasmídeos com um padrão de restrição concordante com

a inserção do fragmento codificador de E3, foram confirmados por reações de PCR para amplificação do inserto (Fig. 3.12).



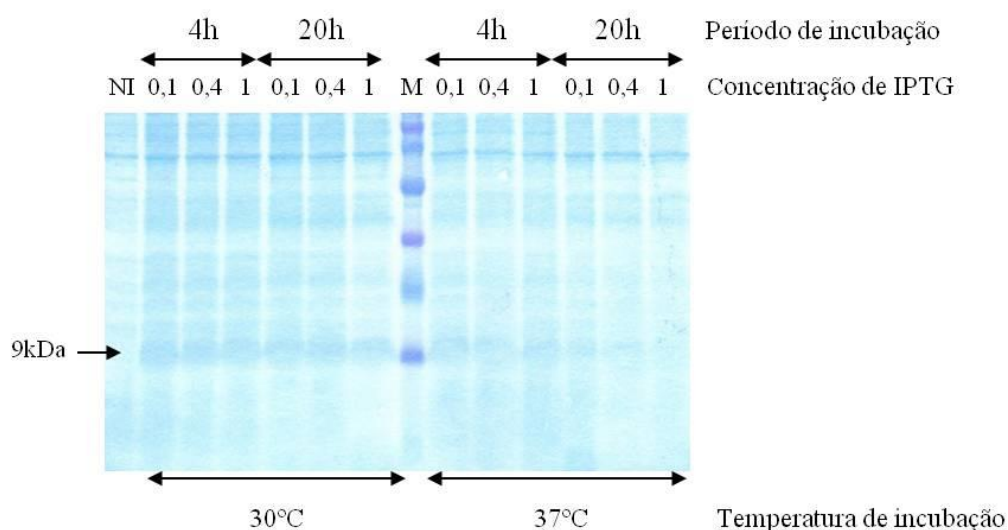
**Figura 3.12 – Confirmação por PCR da presença da sequência codificadora de E3 em pET28b(+) de clones JM109 recombinantes.** M – marcador de tamanhos moleculares (*Ladder* 100pb, Fermentas), + – controlo positivo, 1,2,4,6,8,9,13 – amostras de clones positivos.

O DNA plasmídico recombinante de um dos clones também confirmado por sequenciação foi usado na transformação de células hospedeiras de expressão *E. coli* Rosetta e *E. coli* BL21. A seleção de transformantes foi feita em meio suplementado com canamicina e cloranfenicol e estes confirmados por PCR como anteriormente. Selecionou-se um clone de cada uma das estirpes para subsequente análise da expressão.

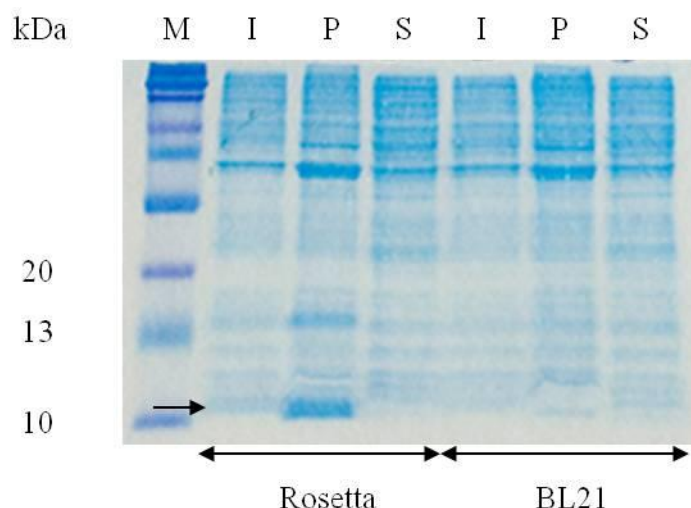
### 3.5 Expressão da proteína de fusão E3-[His]<sub>6</sub>

Culturas dos transformantes de *E. coli* estirpes BL21 e Rosetta obtidos na secção anterior ( $DO_{600nm}=1$ ) foram induzidos com IPTG 1 mM durante 4h, a 37°C, para expressão de E3-[His]<sub>6</sub>. A análise por SDS-PAGE de extratos totais da cultura dos transformantes mostrou a expressão, nas células induzidas, de uma proteína com massa molecular de aproximadamente 9 kDa, correspondendo com grande probabilidade a

E3[His]<sub>6</sub>. Porém, a expressão foi mais abundante em *E. coli* Rosetta pelo que se prosseguiu com o transformante desta estirpe para estudar os efeitos da temperatura (30°C e 37°C), da concentração de indutor (IPTG 0,1, 0,4 e 1 mM) e do tempo de indução (4h e 20h) na expressão da proteína recombinante. A Fig. 3.13 mostra que a expressão é mais abundante a 30°C, independentemente da concentração de IPTG e do tempo de indução. Assim, de rotina as condições de expressão para este transformante foram indução com IPTG 0,4 mM, durante 4h, a 30°C, iniciada quando a cultura atingiu uma DO<sub>600nm</sub>=1. Quando da avaliação da solubilidade da proteína produzida verificou-se que, à semelhança do observado com a fusão CBD-inteína-E3, a maioria da proteína estava na forma insolúvel (Fig. 3.14), o mesmo sucedendo à proteína expressa pelos transformantes de BL21 nestas condições.



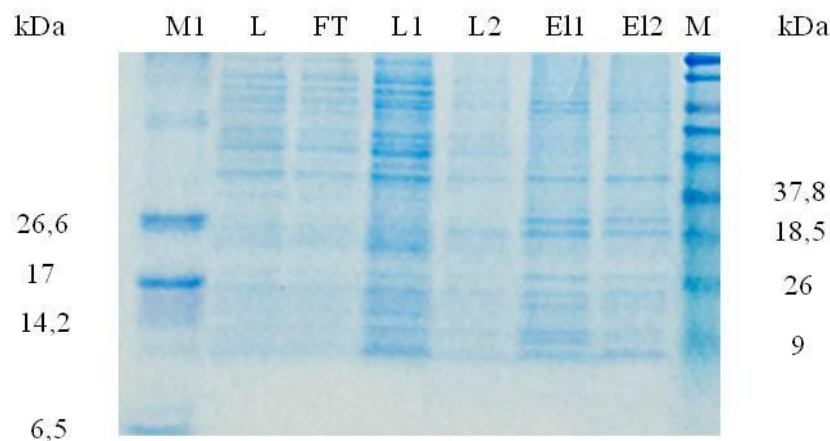
**Figura 3.13 – Expressão de E3[His]<sub>6</sub> pelo clone recombinante de *E. coli* Rosetta induzida a DO<sub>600</sub>=1,0, com diferentes concentrações de IPTG, durante diferentes períodos de tempo e temperaturas de incubação de 30°C e 37°C. Gel Tris-tricina 15% SDS-poliacrilamida. NI- não induzido. M- marcador de massas moleculares (9kDa - 170kDa).**



**Figura 3.14 – Solubilidade de E3[His]<sub>6</sub> expressa em *E. coli* Rosetta e BL21 após indução a DO<sub>600</sub>=1,0, com 0,1mM de IPTG, durante 4h a 30°C.** Gel tris-tricina 9% SDS-poliacrilamida. M- marcador de massas moleculares (10kDa - 175kDa), I- extrato total do clone transformante induzido, P- sedimento (*pellet*, fração insolúvel), S- sobrenadante (fração solúvel).

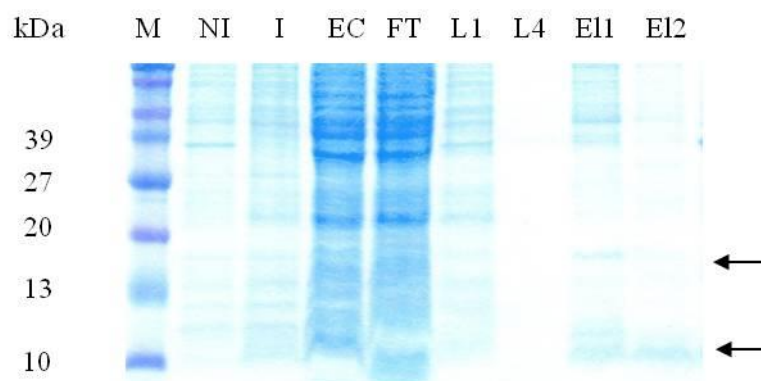
### 3.6 Purificação de E3-[His]6

Apesar da fração solúvel conter menos proteína recombinante, numa tentativa de não usar condições desnaturantes para evitar o processo de renaturação subsequente, procedeu-se à aplicação da fração solúvel nas colunas de níquel para purificação da proteína de fusão por afinidade. Na Fig. 3.15 estão analisadas por SDS-PAGE as proteínas presentes nos diferentes passos da cromatografia de afinidade em colunas de níquel em condições nativas. Verifica-se que a maior parte da proteína recombinante não é retida especificamente pela coluna, refletido na quantidade de proteína recombinante presente no *flowthrough* e na primeira lavagem. As duas eluições efetuadas demonstram, por outro lado, ligação inespecífica das proteínas do lisado à coluna, lavagem pouco eficiente desta e consequente eluição da proteína recombinante com uma enorme quantidade de contaminantes celulares.



**Figura 3.15 – Purificação em condições nativas de E3[His]<sub>6</sub> em colunas de níquel com imidazole 5 mM no tampão de ligação/lavagem.** Gel tris-tricina 9% SDS-poliacrilamida. M1- marcador de massas moleculares (1,060 kDa - 26,6 kDa), L- lisado clarificado (fração solúvel), FT- *flowthroug*, L1- 1ª lavagem, L2- 2ª lavagem, E11- 1ª eluição, E12- 2ª eluição, M- marcador de massas moleculares (9kDa-198kDa).

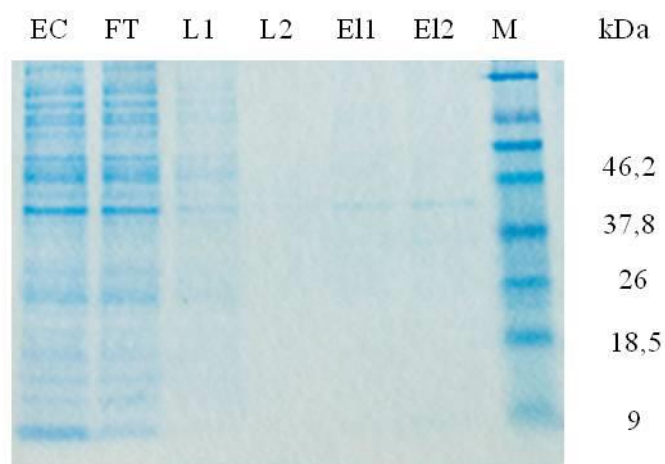
Pondo a hipótese de em condições nativas as caudas de histidina estarem pouco acessíveis para ligação à coluna, numa tentativa de aumentar a retenção da proteína E3-[His]<sub>6</sub> procedeu-se à cromatografia em condições desnaturantes (ureia 8M nos tampões de ligação/lavagem e de eluição) tendo-se observado maior retenção da proteína recombinante e menos proteínas contaminantes (Fig. 3.16).



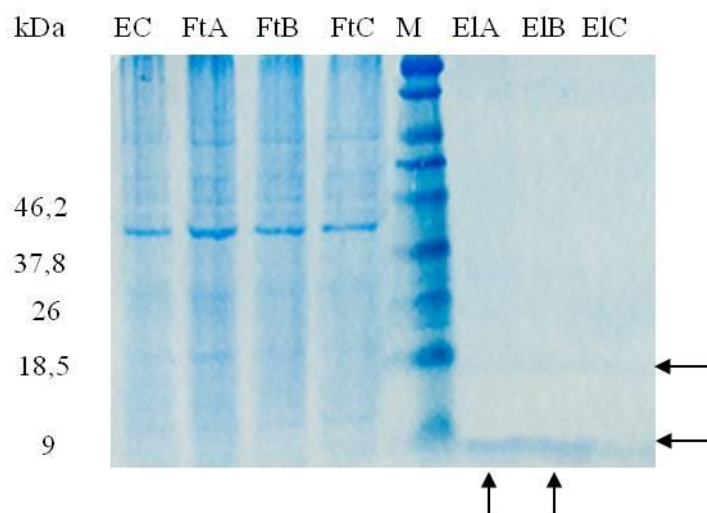
**Figura 3.16 – Purificação em condições desnaturantes de E3[His]<sub>6</sub> em colunas de níquel.** Gel tris-tricina 15% SDS-poliacrilamida. M- marcador de massas moleculares (10 kDa - 175 kDa), NI- não induzido, I- induzido, EC- lisado clarificado, FT- *flowthroug*, L1- lavagem 1, L4- lavagem 4, E11- eluição 1, E12- eluição 2. As setas indicam as espécies moleculares de 18 e 9 kDa que permaneceram associadas à resina de níquel.



Para reduzir a quantidade de contaminantes e aumentar a possibilidade da proteína em condições nativas se ligar à matriz, tentou-se aumentar a especificidade de ligação à coluna através do aumento da concentração de imidazole presente no tampão de ligação/lavagem de 5 mM para 60 mM. Em condições nativas e desnaturantes, observou-se redução da ligação inespecífica de proteínas celulares mas também de E3[His]<sub>6</sub> (Fig.3.17). Uma vez que 60 mM se revelou uma concentração excessiva de imidazol, testaram-se também as concentrações intermédias de 20 mM e 40 mM em condições nativas e desnaturantes. Observou-se menos contaminação com estas concentrações (Fig. 3.18). Curiosamente, surgem duas bandas proteicas com massas moleculares de 18 kDa e 9 kDa, já anteriormente observadas em condições desnaturantes e com imidazole 5 mM (Fig. 3.16) e que não estão presentes no eluato de um extrato de bactérias não transformadas, induzidas e processadas paralelamente nas mesmas condições (dados não apresentados) pelo que deverão ser de proteína heteróloga recombinante. A relação entre as massas sugere duas formas moleculares, dímeros e monómeros de E3[His]<sub>6</sub>.



**Figura 3.17 – Purificação em condições nativas de E3[His]<sub>6</sub> em colunas de níquel com imidazole 60 mM no tampão de ligação/lavagem.** Gel tris-tricina 9% SDS-poliacrilamida. EC- extrato clarificado, FT- flowthroug, L1- lavagem 1, L4- lavagem 4, El1- eluição 1, El2- eluição 2, M- marcador de massas moleculares (9kDa - 198kDa).



**Figura 3.18 – Purificação em condições nativas de E3[His]<sub>6</sub> em colunas de níquel com diferentes concentrações de imidazole no tampão de ligação/lavagem.** A- 20 mM, B- 40mM, C- 60mM de imidazole. Gel tris-tricina 9% SDS-poliacrilamida. EC – lisado clarificado, Ft– *flowthroug*, M- marcador de massas moleculares (9 kDa - 198 kDa), El- eluição.

Para evitar a ligação inespecífica de proteínas das células hospedeiras à coluna testou-se igualmente a adição de 10% e 20% de glicerol e de 1% Triton X-100 no tampão de ligação/lavagem. Observou-se uma redução dos contaminantes celulares, concomitante com uma redução da proteína de interesse, tanto em condições nativas como desnaturantes. Apesar da presença de proteínas celulares, a melhor recuperação da proteína E3[His]<sub>6</sub> foi conseguida em condições nativas, com imidazole 20 mM no tampão de ligação/lavagem e eluição com imidazole 500 mM (Fig. 3.18). A preparação obtida representa uma fração enriquecida e outras abordagens deverão ser consideradas numa tentativa de melhorar a eficiência da purificação.

#### 4. Discussão e Conclusões

Os sistemas bacterianos, designadamente *E. coli*, pela sua simplicidade genética, velocidade de crescimento elevada, alta densidade das culturas celulares e ferramentas desenvolvidas, são a primeira escolha para clonagem, modificação genética ou produção de proteínas recombinantes. No entanto, frequentemente os pequenos polipéptidos expressos em *E.coli* sofrem degradação proteolítica ou são expressos sob a forma insolúvel, *i.e.* como corpos de inclusão, o que dificulta a sua recuperação numa conformação nativa e/ou biologicamente ativa. Uma abordagem para ultrapassar estes problemas é a expressão do polipéptido de interesse como uma proteína de fusão. Ainda, o parceiro de fusão muitas vezes possui características que permitem o seu isolamento por cromatografia de afinidade (*affinity tag*), facilitando a purificação da proteína recombinante. Porém, a separação do polipéptido de interesse do parceiro de fusão, de um modo geral, requiere a utilização de proteases as quais, para além do elevado custo associado e de adicionar ao processo um passo de remoção da protease, criam por vezes problemas adicionais associados a uma degradação proteolítica não específica e ineficiente (70).

A proteína E3 do CHIKV é um pequeno polipéptido glicosilado, secretado, com 64 resíduos de aminoácidos, seis dos quais são resíduos de cisteína, e uma massa molecular de aproximadamente 11 kDa quando expresso em células eucarióticas infetadas (73). E3 do vírus Sindbis, um alfavírus como o CHIKV, possui uma estrutura globular monomérica com três hélices alfa e pelo menos uma ponte dissulfureto entre resíduos de cisteína (57). Considerando estas características de E3, numa tentativa de produzir e purificar esta proteína na forma solúvel optámos pelo sistema de expressão IMPACT™ (*Intein Mediated Purification with an Affinity Chitin-binding Tag*, New England Biolabs). Este sistema implica a expressão de E3 como uma proteína de fusão com uma *affinity tag* de massa molecular elevada que, pela sua dimensão, poderá conferir estabilidade a E3 e proporcionar a sua síntese na forma solúvel. No entanto, a característica mais importante do sistema é a utilização de proteínas com atividade de *splicing* proteico, *i.e.* inteínas, para separar a proteína de interesse da *affinity tag*, de que a própria inteína faz parte, distinguindo-se dos outros sistemas de purificação pela sua capacidade para isolar, num único passo cromatográfico, a proteína recombinante nativa

sem o uso de proteases. A inteína possui fundido um domínio de ligação à quitina para a purificação por afinidade da proteína de fusão recombinante numa coluna de resina de quitina. A indução da atividade de inteína na coluna, usando reagentes de tiol ou variações de pH, permite teoricamente libertar a proteína de interesse da *affinity tag* e a sua eluição como um produto isolado. Na literatura, este sistema tem surgido frequentemente associado à expressão e purificação com êxito de pequenos polipéptidos ricos em cisteínas, com modificações pós-tradução naturais e com atividade farmacológica. São exemplos o péptido antimicrobiano SMAP-29 (51), estaterina humana (49), péptidos amiloides  $\beta$  (6), péptido antimicrobiano MDCD-1L (35), e neurotoxina Huwentoxin-I (12).

A clonagem da sequência codificadora de E3 no plasmídeo de expressão pTYB21 do sistema IMPACT™, permitiu a expressão de uma proteína de fusão com a massa molecular esperada, *i.e.* cerca de 63 kDa, conforme demonstrado por análise de SDS-PAGE e *Western-blot* com anticorpos policlonais anti-CBD, para uma proteína de fusão consistindo em domínio de ligação à quitina (CBD), inteína Sce VMA1 e E3. Porém, contrariando um pouco as expectativas, surgiram vários problemas associados à proteína de fusão produzida. Em primeiro lugar, em extratos de células totais observou-se a sua produção em menor quantidade que a *affinity tag* CBD-inteína expressa por transformantes contendo o plasmídeo pTYB21 selvagem. A CBD-inteína é considerada uma proteína estável em *E. coli* ER2566, a estirpe deficiente nas proteases *lon* e *ompT* usada para expressão, pelo que a fusão com E3 poderá eventualmente gerar uma taxa de tradução mais baixa. Esta pode ser devida à presença de codões raros para *E. coli* na sequência codificadora da proteína E3. É conhecido que o nível de expressão forçadamente elevado de proteínas heterólogas conseguido com promotores fortes, como é o promotor T7, pode esgotar o número relativamente baixo de tRNAs disponíveis em *E. coli* para estes codões. Este facto poderá levar à redução da velocidade da tradução dos mRNAs em que ocorram estes codões ou à terminação prematura da síntese proteica e degradação do mRNA (15,44). Quando da análise da sequência codificadora de E3 (Fig. 2.2), verificou-se que, distribuídos pela sequência, 12 dos 64 resíduos de aminoácidos (19%) são codificados por codões raros para *E. coli*. Entre as abordagens que poderão permitir ultrapassar esta dificuldade está a modificação daqueles codões raros por mutagénesis dirigida ou no caso de polipéptidos

pequenos, como é o caso de E3, através da síntese de um gene sintético desenhado com base na alteração daqueles codões para codões frequentemente usados por *E. coli*. Uma alternativa mais simples é o uso de uma estirpe de *E. coli* que tenha sido modificada para expressar tRNAs destes codões raros, de que são exemplos as estirpes BL21-Codon Plus e Rosetta. Nesta fase do trabalho, devido a não termos tido acesso a estas estirpes, não nos foi possível avaliar o efeito da mudança de estirpe hospedeira na eficiência da expressão de CBD-inteína-E3.

Um outro problema com que nos deparamos foi a produção da proteína de fusão recombinante CBD-inteína-E3 maioritariamente sob a forma insolúvel. As bactérias que expressam níveis elevados de proteínas heterólogas estão sujeitas a *stresses* metabólicos e conformacionais (25). Nesta situação a limitação dos moduladores de enrolamento moleculares (chaperones) e o processamento das proteínas associado a respostas de *stress* celular pode originar grandes quantidades de agregados proteicos (62,50,89). Através da otimização de algumas condições de cultura pode-se alterar a quantidade total e da forma insolúvel produzida (77). A utilização de temperaturas baixas nos processos de produção geralmente afeta a qualidade conformacional das proteínas recombinantes e diminui a fração de proteína insolúvel (88). De facto a redução da temperatura para 30°C ou 25°C aumentou a quantidade de proteína de fusão produzida. No entanto, foi com temperaturas de aproximadamente 12°C que observámos um aumento substancial da proteína solúvel, cerca de 50% da proteína recombinante total. Porém, este aumento do rendimento da proteína recombinante solúvel implicou o aumento do tempo de indução da expressão para 16 horas. Igualmente numa tentativa de aumentar a produção e a solubilidade de CBD-inteína-E3 foram testadas várias concentrações baixas do indutor da expressão IPTG (0,01, 0,05, 0,1, 0,4 mM) não se tendo registado um aumento da fração solúvel. De facto, quando estas concentrações de IPTG são testadas com várias combinações de temperatura observa-se uma influência maior da temperatura. Assim, de rotina, a produção de proteína para purificação decorreu a 12°C, durante 16 horas, na presença de IPTG 0,1 mM.

A formação de corpos de inclusão poderá igualmente estar relacionada com o facto de E3 ser uma proteína que sofre modificações pós-tradução, nomeadamente glicosilação e formação de pontes dissulfureto. Estas modificações pós-tradução, que têm um papel importante na aquisição da conformação nativa da proteína, na sua estabilidade e

solubilidade, não ocorrem naturalmente em *E. coli*. No citoplasma das estirpes comuns de *E. coli*, as cisteínas são mantidas ativamente no estado reduzido através de uma via que envolve redutase de tio-redoxina e redutase da glutathione (65). Porém, foram desenvolvidas estirpes mutantes de *E. coli* para estes dois genes (*trxB*<sup>-</sup>, *gor*<sup>-</sup>), designadamente *E. coli* Origami, que permitem a formação de pontes dissulfureto no citoplasma de *E. coli*. A utilização da estirpe Origami para expressão de CBD-inteína-E3 não aumentou a solubilidade da proteína recombinante relativamente à estirpe ER2566 normalmente usada e sem estas mutações.

Um dos motivos mais evocados para a escolha do sistema IMPACT™ para a expressão de proteínas recombinantes reside na aparente simplicidade da purificação da proteína de interesse num único passo cromatográfico em colunas de afinidade devido à autoclivagem pela inteína. Essencialmente, pode-se optar por dois tipos de inteínas diferentes, aquelas cuja atividade é induzida por alterações de pH e as que são ativadas por reagentes tiol. Uma limitação importante das primeiras é a ocorrência de autoclivagem prematura durante a expressão com consequente libertação e perda da proteína de interesse (21). Apesar de E3 ser um péptido rico em cisteínas e os reagentes de tiol recomendados para a indução da clivagem poderem destruir as pontes dissulfureto, optámos por escolher o sistema com a inteína Sce MVA1 que é ativada por reagentes de tiol e fazer a indução da clivagem com cisteína como recomendado pelo fabricante (New England Biolabs) para esta situação. A incapacidade em detetar por SDS-PAGE/coloração com Azul Coomassie a eluição de uma proteína com a massa molecular de E3 e a retenção na coluna de espécies moleculares com massas compatíveis com clivagem de E3 (56 kDa) e não clivagem de E3 (64 kDa), levou-nos a alterar as condições de clivagem para ultrapassar a clivagem incompleta observada. A utilização de DTT em concentração elevada (50 mM) e o aumento do tempo de clivagem até 5 dias melhorou a eficiência da clivagem, embora ainda se observasse a proteína de fusão completa na resina após a clivagem. Uma vez que o primeiro resíduo de aminoácido da proteína de interesse influencia a eficiência da clivagem pela inteína, o primeiro aminoácido de E3 foi alterado para treonina pelo que a eficiência de clivagem deveria ser da ordem dos 80% após 16 horas (bula do kit IMPACT™, New England Biolabs). O facto de aparentemente se estar longe deste valor pode ser reflexo da estrutura secundária de E3 dificultar o acesso da inteína à sequência de clivagem.

Curiosamente, apesar do aumento da clivagem, continuou-se a verificar a incapacidade de detetar E3 eluída. No entanto passou-se a detetar na resina, após eluição, duas espécies proteicas de massa molecular baixa, uma delas com a massa molecular correspondente a E3. Estes resultados sugerem ser possível a clivagem de E3, ainda que com um rendimento baixo, mas difícil a sua eluição da coluna, mesmo com a inclusão de Triton X-100 e NaCl 1M no tampão de eluição como recomendado pelo fabricante. Aparentemente E3 terá afinidade para quitina. Esta característica só poderá ser confirmada quando houver um anticorpo específico de E3 que permita a sua identificação inequívoca.

Perante a incapacidade para se obter uma preparação de E3 purificada com o sistema IMPACT™, optámos por usar a fusão de E3 com a *affinity tag* de seis resíduos de histidina, um sistema largamente usado para expressar e purificar proteínas recombinantes e para o qual existem vários protocolos de purificação bem estabelecidos e matrizes disponíveis. Acresce que é um parceiro de fusão pequeno e fácil de adicionar e com probabilidade reduzida de interferir com a função da proteína com a qual está fundida. A clonagem no plasmídeo pET28b(+) permitiu a expressão de uma proteína com uma massa molecular de cerca de 9 kDa, compatível com a fusão de 6 resíduos de histina no extremo carboxilo de E3. As estirpes de *E. coli* usadas na expressão foram BL21 e Rosetta, observando-se maior expressão nesta última. A estirpe Rosetta é portadora do plasmídeo pRARE que codifica seis tRNAs para codões raramente usados em *E. coli* e se considerarmos a elevada percentagem (19%) de codões raros para *E. coli* presentes em E3, este resultado era espectável. Quando do estudo do efeito da temperatura na expressão da proteína recombinante mais uma vez observámos que a redução da temperatura de expressão de 37°C para 30°C aumentava a quantidade de proteína produzida, a maioria da qual estava porém na forma insolúvel. Inicialmente a fração solúvel quando aplicada em colunas de níquel e processada em condições nativas não permitiu reter especificamente na coluna de níquel uma proteína com massa molecular compatível com E3[His]<sub>6</sub> e consequentemente a sua eluição como espécie molecular isolada. Este resultado poderia prender-se com o facto de em condições nativas a proteína de fusão adquirir uma conformação que ocultava a cauda de histidinas. De facto, quando do processamento dos extratos proteicos e purificação em condições desnaturantes, que deveriam permitir a exposição da cauda de histidinas,

observou-se retenção e eluição de duas espécies proteicas de 18 kDa e 9 kDa, esta última com o tamanho esperado para E3[His]<sub>6</sub>, e um fundo de proteínas contaminantes individualmente pouco abundantes. Foram testadas algumas modificações ao protocolo de purificação, nomeadamente a inclusão de glicerol e Triton X-100 e o aumento da concentração de imidazole nos tampões de ligação e lavagem, para reduzir a ligação inespecífica de outras proteínas. Observámos que a utilização de imidazole nas concentrações de 20 e 40 mM resultou numa preparação mais enriquecida na espécie molecular com uma massa de aproximadamente 9 kDa, correspondente à esperada para E3[His]<sub>6</sub>, tanto em condições desnaturantes como nativas. Assim, a incapacidade inicialmente observada de retenção de E3[His]<sub>6</sub> na coluna de níquel em condições nativas deverá dever-se ao excesso de ligação inespecífica de outras espécies proteicas e não apenas à inacessibilidade das caudas de histidina. As massas moleculares das duas bandas específicas das células transformadas com o plasmídeo recombinante e eluídas da coluna de quitina sugerem uma relação dímero/monómero. A proteína E3 do vírus Sindbis foi expressa em bactérias como proteína de fusão [His]<sub>6</sub>-SUMO-E3 e E3 recuperada após dois passos sucessivos de cromatografia de afinidade em colunas de níquel (57). Neste caso, E3 foi isolada na forma solúvel como monómeros. No entanto, a proteína E3 do vírus Sindbis difere da do vírus CHIKV na sua composição em aminoácidos tendo menos dois resíduos de cisteína. Por outro lado, mesmo dando origem a dímeros a análise por SDS-PAGE deveria separá-los nos monómeros correspondentes, pelo que a identidade desta proteína com massa molecular mais elevada deverá ser analisada.

Igualmente, apesar da confirmação por sequenciação da construção presente no plasmídeo recombinante e da ligação às colunas de níquel, possível devido à síntese em grelha da cauda de histidinas situada no extremo carboxilo de E3, a confirmação da proteína produzida carece da identificação com anticorpos específicos. Tanto quanto sabemos da literatura, não existem anticorpos contra E3. Assim, esta preparação de proteína poderá ser usada para imunização de murganhos e os anticorpos policlonais produzidos testados relativamente à sua reatividade com extratos proteicos de células infetadas com CHIKV, *e.g.* por análise *Western-blot* ou por imunofluorescência.

Considerando que:



- 1) o alastramento das epidemias de CHIKV e de vírus da dengue é um processo dinâmico em expansão,
- 2) os dois vírus e respetivos vetores são maioritariamente endémicos em regiões geográficas sobreponíveis,
- 3) os quadros clínicos são muito difíceis de distinguir na fase inicial da infeção,
- 4) os países afetados têm poucos recursos para a realização do diagnóstico laboratorial na fase aguda da doença essencialmente baseado em técnicas de RT-PCR,

pensamos que um teste de antigenémia específico para CHIKV a adicionar à deteção de IgM, à semelhança do que acontece para os testes rápidos para dengue em que no mesmo teste se pode detetar a proteína NS1 e IgM/IgG, seria uma mais valia em termos de sensibilidade e especificidade dos testes rápidos para CHIKV. A proteína E3 foi descrita como sendo secretada nas células infetadas por CHIKV, no entanto desconhece-se se o mesmo acontece *in vivo* numa infeção natural e, em caso afirmativo, qual a sua cinética na circulação sanguínea. Estes são parâmetros importantes para avaliar o seu potencial como alvo de um teste de antigenémia. Tanto a confirmação da secreção de E3 em culturas celulares como a análise do seu comportamento como antigénio circulante está dependente da existência de anticorpos específicos e estes só poderão ser produzidos de forma eficaz se dispusermos de uma preparação de antigénio relativamente puro para imunização. Pensamos que tanto o protocolo do sistema IMPACT como o da fusão com caudas de histidina podem ser melhorados. A aquisição de uma estirpe de *E. coli*, *e.g.* Rosetta-gami, simultaneamente deficiente nos genes das redutases e que sintetize tRNAs de codões raros para *E. coli* ou, em alternativa, a produção de um gene sintético para E3 sujeito às regras de enviesamento de utilização de codões para *E. coli*, poderão ser uma mais-valia para a expressão em ambos os sistemas. A inclusão de um péptido espaçador entre a inteína e E3 ou a escolha de outra inteína, *i.e.* vetor de expressão alternativo do sistema IMPACT™, cuja atividade seja induzida por alterações de pH ou que tenha uma sequência de clivagem diferente poderão melhorar a clivagem da proteína de fusão CBD-inteína-E3. Por outro lado, um ajuste mais fino das condições do passo de cromatografia em colunas de níquel poderá reduzir os contaminantes proteicos da preparação de E3[His]<sub>6</sub> e a curto prazo resultar numa preparação de antigénio relativamente pura e em maior quantidade.

## 5. Bibliografia

1. **Akahata W, et al.** 2010. A virus-like particle vaccine for epidemic Chikungunya virus protects nonhuman primates against infection. *Nature Medicine* **16(3)**:334-8.
2. **Angelini P, et al.** 2008. Chikungunya emergency in Emilia-Romagna: learning through experience. *Epidemiologia e Prevenzione* **32(4-5)**:258-63.
3. **Arankulle V A, et al.** 2007. Genetic divergence of Chikungunya viruses in India (1963-2006) with special reference to the 2005-2006 explosive epidemic. *The Journal of General Virology* **88(Pt 7)**:1967-76.
4. **Bernard E, Solignat M, Gay B, Chazal N, Higgs S, Devaux C, Briant L.** 2010. Endocytosis of chikungunya virus into mammalian cells: role of clathrin and early endosomal compartments. *PLoS One* **5(7)**:e11479.
5. **Blacksell SD, et al.** 2011. Poor diagnostic accuracy of commercial antibody-based assays for the diagnosis of acute Chikungunya infection. *Clinical and Vaccine Immunology:CVI* **18(10)**:1773-5.
6. **Bockhorn JJ, et al.** 2010. Novel semisynthetic method for generating full length beta-amyloid peptides. *Biopolymers* **94(4)**:511-20.
7. **Breakwell L, et al.** 2007. Semliki Forest virus nonstructural protein 2 is involved in suppression of the type I interferon response. *Journal of Virology* **81(16)**:8677-84.
8. **Brighton SW.** 1984. Chloroquine phosphate treatment of chronic Chikungunya arthritis. An open pilot study. *South African Medical Journal* **66(6)**:217-8.
9. **Briolant S, Garin D, Scaramozzino N, Jouan A, Crance JM.** 2004. In vitro inhibition of Chikungunya and Semliki Forest viruses replication by antiviral compounds: synergistic effect of interferon-alpha and ribavirin combination. *Antiviral Research* **61(2)**:111-7.
10. **Burt F J, Rolph M S, Rulli N E, Mahalingam S, Heise M T.** 2012. Chikungunya: a re-emerging virus. *Lancet* **379(9816)**:662-71.
11. **Carey DE.** 1971. Chikungunya and dengue: a case of mistaken identity? *Journal of the History of Medicine and Allied Sciences* **26(3)**:243-62.

12. **Che N, Wang L, Gao Y, An C.** 2009. Soluble expression and one-step purification of a neurotoxin Huwentoxin-I in *Escherichia coli*. *Protein Expression and Purification* **65(2)**:154-9.
13. **Cho B, Kim J, Cho JE, Jeon BY, Park S.** 2008. Expression of the capsid protein of Chikungunya virus in a baculovirus for serodiagnosis of Chikungunya disease, *Journal of Virological Methods*. 154–159.
14. **Couderc T, et al.** 2009. Prophylaxis and therapy for Chikungunya virus infection. *The Journal of Infectious Diseases* **200(4)**:516-23.
15. **Deana A, Ehrlich R, Reiss C.** 1998. Silent mutations in the *Escherichia coli* ompA leader peptide region strongly affect transcription and translation in vivo. *Nucleic Acids Research* **26(20)**:4778-82.
16. **Donoso Mantke O, Niedrig M; ENIVD members.** 2007. Laboratory capacity for detection of chikungunya virus infections in Europe. *Euro Surveillance: European Communicable Disease Bulletin* **12(9)**:E070913.2.
17. **Duong V, et al.** 2012. Reemergence of Chikungunya Virus in Cambodia. *Emerging Infectious Diseases* **Vol.18**, No. 12.
18. **Eckels KH, Harrison VR, Hetrick FM.** 1970 . Chikungunya virus vaccine prepared by Tween-ether extraction. *Applied Microbiology* **19(2)**:321-5.
19. **Economopoulou A, et al.** 2009. Atypical Chikungunya virus infections: clinical manifestations, mortality and risk factors for severe disease during the 2005-2006 outbreak on Réunion. *Epidemiology and Infection* **137(4)**:534-41.
20. **Edelman R, et al.** 2000. Phase II safety and immunogenicity study of live chikungunya virus vaccine TSI-GSD-218. *The American Journal of Tropical and Medicine and Hygiene* **62(6)**:681-5.
21. **Fong BA, Gillies AR, Ghazi I, LeRoy G, Lee KC, Westblade LF, Wood DW.** 2010. Purification of *Escherichia coli* RNA polymerase using a self-cleaving elastin-like polypeptide tag. *Protein Science* **19(6)**:1243-52.
22. **Frolov I, Hardy R, Rice CM.** 2001. Cis-acting RNA elements at the 5' end of Sindbis virus genome RNA regulate minus- and plus-strand RNA synthesis. *RNA* **7(11)**:1638-51.

23. **Garmashova N, Gorchakov R, Frolova E, Frolov I.** June 2006. Sindbis virus nonstructural protein nsP2 is cytotoxic and inhibits cellular transcription. *Journal of Virology* **80(12)**:5686-96.
24. **Garoff H, Huylebroeck D, Robinson A, Tillman U, Liljeström P.** 1990. The signal sequence of the p62 protein of Semliki Forest virus is involved in initiation but not in completing chain translocation. *The Journal of Cell Biology* **111(3)**:867-76.
25. **Gasser B, et al.** 2008. Protein folding and conformational stress in microbial cells producing recombinant proteins: a host comparative overview. *Microbial Cell Factories* **7**: 11.
26. **Gay B, Bernard E, Solignat M, Chazal N, Devaux C, Briant L.** 2012. pH-dependent entry of chikungunya virus into *Aedes albopictus* cells. *Infection Genetics and Evolution: Journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases* **12(6)**:1275-81.
27. **Gérardin P, et al.** 2008. Multidisciplinary prospective study of mother-to-child chikungunya virus infections on the island of La Réunion. *PloS Medicine* **5(3)**:60
28. **Gould EA, Gallian P, De Lamballerie X, Charrel RN.** 2010. First cases of autochthonous dengue fever and chikungunya fever in France: from bad dream to reality! *Clinical Microbiology and Infection* **16(12)**:1702-4
29. **Grakoui A, Levis R, Raju R, Huang HV, Rice CM.** 1989. A cis-acting mutation in the Sindbis virus junction region which affects subgenomic RNA synthesis. *Journal of Virology* **63(12)**:5216-27.
30. **Grivard P, et al.** 2007. Molecular and serological diagnosis of Chikungunya virus infection. *Pathologie-Biologie (Paris)* **55(10)**:490-4
31. **Haider SR, Reid HJ, Sharp BL.** 2010. Modification of tricine-SDS-PAGE for online and offline analysis of phosphoproteins by ICP-MS. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. **397**:655-664
32. **Hardy WR, Hahn YS, de Groot RJ, Strauss EG, Strauss JH.** 1990. Synthesis and processing of the nonstructural polyproteins of several temperature-sensitive mutants of Sindbis virus. *Virology* **177(1)**:199-208

33. **Harrison VR, Eckels KH, Bartelloni PJ, Hampton C.** 1971. Production and evaluation of a formalin-killed Chikungunya vaccine. *Journal of Immunology* **107(3)**:643-7
34. **Her Z, Kam YW, Lin RT, Ng LF.** 2009. Chikungunya: a bending reality, *Microbes and Infection* **11(14-15)**:1165-76.
35. **Inpyo H, Kim Y, Choi S.** 2010. Simple Purification of the Human Antimicrobial Peptide Dermcidin (MDCD-1L) by Intein-Mediated Expression in *E.coli*, *Journal of Microbiology and Biotechnology* **20(2)**: 350-355.
36. **Ivanova L, Schlesinger MJ.** 1993. Site-directed mutations in the Sindbis virus E2 glycoprotein identify palmitoylation sites and affect virus budding. *Journal of Virology* **67(5)**:2546-51.
37. **Jose J, Snyder JE, Kuhn RJ.** 2009. A structural and functional perspective of alphavirus replication and assembly. *Future Microbiology* **4**: 837–856.
38. **Jupp PG, Cornel AJ.** 1988. Vector competence tests with Rift Valley fever virus and five South African species of mosquito. *Journal of the American Mosquito Control Association* **4(1)**:4-8.
39. **Kashyap RS, et al.** 2010. Detection of viral antigen, IgM and IgG antibodies in cerebrospinal fluid of Chikungunya patients with neurological complications. *Cerebrospinal Fluid Research* **7**:12.
40. **Khan AH, et al.** 2002. Complete nucleotide sequence of chikungunya virus and evidence for an internal polyadenylation site, *Journal of General Virology* **83**: 3075-3084.
41. **Khan M, Santhosh SR, Tiwari M, Lakshmana Rao PV, Parida M.** 2010. Assessment of in vitro prophylactic and therapeutic efficacy of chloroquine against Chikungunya virus in vero cells. *Journal of Medical Virology* **82(5)**:817-24.
42. **Kirkland BH, Keyhani NO.** 2011. Expression and purification of a functionally active class I fungal hydrophobin from the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* in *E.coli*. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* **38 (2)**: 327-335.

43. **Kujala P, Ikäheimonen A, Ehsani N, Vihinen H, Auvinen P, Kääriäinen L.** 2001. Biogenesis of the Semliki Forest virus RNA replication complex. *Journal of Virology* **75(8)**:3873-84.
44. **Kurland C, Gallant J.** 1996. Errors of heterologous protein expression. *Current Opinion in Biotechnology* **7(5)**:489-93.
45. **Labadie K, et al.** 2010. Chikungunya disease in nonhuman primates involves long-term viral persistence in macrophages. *The Journal of Clinical Investigation* **120(3)**:894-906.
46. **Lamballerie X, et al.** 2008, On chikungunya acute infection and chloroquine treatment. *Vector Borne Zoonotic Diseases* **8(6)**:837-9.
47. **Laras K, et al.** 2005. Tracking the re-emergence of epidemic chikungunya virus in Indonesia. *Transactions of the Royal Society Tropical Medicine and Hygiene* **99(2)**:128-41.
48. **Liu LN, Lee H, Hernandez R, Brown DT.** 1996. Mutations in the endo domain of Sindbis virus glycoprotein E2 block phosphorylation, reorientation of the endo domain, and nucleocapsid binding. *Virology* **222(1)**:236-46.
49. **Manconi B, et al.** 2010. Expression, purification, phosphorilation and characterization of recombinant human statherin; Protein expression and purification. 219-225.
50. **Martínez-Alonso M, et al.** 2009. Rehosting of bacterial chaperones for high-quality protein production. *Applied and Environmental Microbiology* **75(24)**:7850-4.
51. **Morassutti C, De Amicis F, Bandiera A, Marchetti S.** 2005. Expression of SMAP-29 cathelicidin-like peptide in bacterial cells by intein-mediated system. *Protein Expression and Purification*. **39(2)**:160-8.
52. **Muthumani K, et al.** 2008. Immunogenicity of novel consensus-based DNA vaccines against Chikungunya virus. *Vaccine* **26(40)**:5128-34.
53. **Ng, LC, Hapuarachchi HC.** 2010. Tracing the path of Chikungunya virus- Evolution and adaptation. *Infection, Genetics and Evolution* **10(7)**:876-85.
54. **Panning M, Grywna K, van Esbroeck M, Emmerich P, Drosten C.** 2008. Chikungunya fever in travelers returning to Europe from the Indian Ocean region, 2006. *Emerging Infectious Diseases* **14(3)**:416-22.

55. **Panning M, Hess M, Fischer W, Grywna K, Pfeffer M, Drosten C.** 2009. Performance of the RealStar Chikungunya virus real-time reverse transcription-PCR kit. *Journal of Clinical Microbiology* **47(9)**:3014-6.
56. **Parida MM.** 2008. Rapid and real-time detection technologies for emerging viruses of biomedical importance. *Journal of Biosciences* **33(4)**:617-28.
57. **Parrot MM, Sitarski SA, Arnold JA, Picton LK, Hill RB, and Mukhopadhyay S.** 2009. Role of conserved cysteins in the Alphavirus E3 protein. *Journal of Virology*. 2584-2591.
58. **Pastorino B, et al.** 2004. Epidemic resurgence of Chikungunya virus in democratic Republic of the Congo: identification of a new central African strain. *Journal of Medical Virology* **74(2)**:277-82.
59. **Pfeffer M, Linssen B, Parke MD, Kinney RM.** 2002. Specific detection of chikungunya virus using a RT-PCR/nested PCR combination. *Journal of Veterinary Medicine. B, Infectious Diseases and Veterinary Public Health* **49(1)**:49-54.
60. **Pialoux G, Gauzère BA, Jauréguiberry S, Strobel M.** 2007. Chikungunya, an epidemic arbovirosis. Vol 7.
61. **Plante K, et al.** 2011. Novel chikungunya vaccine candidate with an IRES-based attenuation and host range alteration mechanism. *PLoS Pathogens* **7(7)**:e1002142.
62. **Prouty WF.** 1975. Fate of MS2 proteins synthesized in *Escherichia coli* exposed to amino acid analogues. *Journal of Virology* **16(4)**:1090-3.
63. **Queyriaux B, Simon F, Grandadam M, Michel R, Tolou H, Boutin JP.** 2008. Clinical burden of chikungunya virus infection. *The Lancet Infectious Diseases*. **8(1)**:2-3.
64. **Ravichandran R, Manian M.** 2008. Ribavirin therapy for Chikungunya arthritis. *Journal of Infection on Developing Countries* **2(2)**:140-2.
65. **Ritz D, Patel H, Doan B, Zheng M, Aslund F, Storz G, Beckwith J.** 2000. Thioredoxin 2 is involved in the oxidative stress response in *Escherichia coli*. *The Journal of Biological Chemistry* **275(4)**:2505-12.
66. **Robinson M C.** 1955. An epidemic of virus disease in Southern Province, Tanganyika Territory, in 1952-53. I. Clinical features **49(1)**:28-32

67. **Rümenapf T, Strauss EG, Strauss JH.** 1994. Subgenomic mRNA of Aura alphavirus is packaged into virions. *Journal of Virology* **68(1):56-62.**
68. **Scott C. Weaver<sup>1\*</sup> and William K. Reisen.** 2010. Present and Future Arboviral Threats. *Antiviral Research* **85(2):328-45**
69. **Sergon K, et al.** 2007. Seroprevalence of Chikungunya virus infection on Grande Comore Island, union of the Comoros, 2005. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* **76(6):1189-93.**
70. **Sharma SS, Chong S, Harcum SW.** 2006. Intein-mediated protein purification of fusion proteins expressed under high-cell density conditions in *E. coli*. *Journal of Biotechnology* **125(1):48-56.**
71. **Shirako Y, Strauss JH.** 1994. Regulation of Sindbis virus RNA replication: uncleaved P123 and nsP4 function in minus-strand RNA synthesis, whereas cleaved products from P123 are required for efficient plus-strand RNA synthesis. *Journal of Virology* **68(3):1874-85.**
72. **Shukla J, et al.** 2009. Development and evaluation of antigen capture ELISA for early clinical diagnosis of chikungunya. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* **65(2):142-9.**
73. **Simizu B, Yamamoto K, Hashimoto K, and Ogata T.** 1984. Strutral proteins of chikungunya. *Journal of virology* **51(1):254-8.**
74. **Simon F, Javelle E, Oliver M, Leparc-Goffart I, Marimoutou C.** 2011. Chikungunya virus infection. *Current Infectious Disease Reports* **13(3): 218–228.**
75. **Sissoko D, et al.** 2009. Post-epidemic Chikungunya disease on Reunion Island: course of rheumatic manifestations and associated factors over a 15-month period. *PLoS Neglected Tropical Diseases* **3(3):e389.**
76. **Solignat M, Gay B, Higgs S, Briant L, Devaux C.** 2009. Replication cycle of chikungunya: A re-emerging arbovirus, *Virology* 393. 183–197.
77. **Sorensen HP, Mortensen KK.** 2005. Soluble expression of recombinant proteins in the cytoplasm of *Escherichia coli*, *Microbial Cell Factories* **4:1.**
78. **Sourisseau M. et al.** 2007. Characterization of Reemerging Chikungunya Virus, *PLoS Pathogene* **3(6): e89.**



79. **Strauss EG, Rice CM, Strauss JH.** 1984. Complete nucleotide sequence of the genomic RNA of Sindbis virus. *Virology*. 133(1):92-110.
80. **Sudeep AB, Parashar D.** 2008. Chikungunya: an overview. *Journal of Biosciences* **33(4)**:443–449.
81. **Suomalainen M, Liljeström P, Garoff H.** 1992. Spike protein-nucleocapsid interactions drive the budding of alphaviruses. *Journal of Virology* **66(8)**:4737-47.
82. **Tandale BV, et al.** 2009. Systemic involvements and fatalities during Chikungunya epidemic in India, 2006. *Journal of Clinical Virology* **46(2)**:145-9.
83. **Tellinghuisen TL, Perera R, Kuhn RJ.** 2001. Genetic and biochemical studies on the assembly of an enveloped virus. *Genetic Engineering* **23**:83-112.
84. **Tsetsarkin K, Higgs S, McGee CE, De Lamballerie X, Charrel RN, Vanlandingham DL.** 2006. Infectious clones of Chikungunya virus (La Réunion isolate) for vector competence studies. *Vector Borne Zoonotic Diseases* **6(4)**:325-37
85. **Tsetsarkin KA, Vanlandingham DL, McGee CE, Higgs S.** 2007. A single mutation in chikungunya virus affects vector specificity and epidemic potential. *PLoS Pathogenes* **3(12)**:e201.
86. **Tsetsarkin KA, et al.** 2011. Chikungunya virus emergence is constrained in Asia by lineage-specific adaptive landscapes. *PNAS* **Vol.108**, No.19. 7872–7877.
87. **Turell MJ, Malinoski FJ.** 1992. Limited potential for mosquito transmission of a live, attenuated chikungunya virus vaccine. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* **47(1)**:98-103.
88. **Vera A, Montalbán N, Arís A, Villaverde A.** 2007. The conformational quality of insoluble recombinant proteins is enhanced at low growth temperatures. *Biotechnology and Bioengineering* Vol. 96.
89. **Villaverde A, Carrió MM.** 2003. Protein aggregation in recombinant bacteria: biological role of inclusion bodies. *Biotechnology Letters* **25(17)**:1385-95. Review.
90. **Wang E, et al.** 2008. Chimeric alphavirus vaccine candidates for chikungunya. *Vaccine* **26(39)**:5030-9.

91. **Weaver SC, Reisen WK.** 2010. Present and future arboviral threats, *Antiviral research* 85. 328-345.
92. **Wengler G, Wörkner D.** 1992. Identification of a sequence element in the alphavirus core protein which mediates interaction of cores with ribosomes and the disassembly of cores. *Virology* **191(2)**:880-8.
93. **Yap G, *et al.*** 2010. Evaluation of Chikungunya diagnostic assays: differences in sensitivity of serology assays in two independent outbreaks. *PLoS Neglected Tropical Diseases* **4(7)**:e753.

## **6. ANEXOS**

### **Anexo 1: Composição de meios e soluções**

**1. Tris-EDTA (TE):**

Tris 25mM, pH 8,0

10mM EDTA

**2. Meio de crescimento de Luria-Bertani (LB):**

10 g de Bacto-triptona

5 g de Extrato de levedura

10 g de NaCl

15 g Agar\*

Adicionar água para 1000 ml e autoclavar (121°C, 30 minutos)

\*Não adicionar para LB líquido

**3. Placas LB agar**

LB sólido (agar Bacto a 1,5% (p/v) em LB líquido)

**4. Meio SOC (100ml):**

2g Triptona

0,5g Extrato de Levedura

0,05g NaCl (10mM)

2,5mM KCl 250 mM, ajustar o pH para 7,0 com NaOH 5 N,

10 mM MgCl<sub>2</sub>

10 mM MgSO<sub>4</sub>

20 mM Glucose

**5. Meio de transformação e armazenamento (TSS):**

LB 1X

10% (v/v) PEG6000

5% (v/v) DMSO

50 mM MgSO<sub>4</sub>

pH 6,5

**6. Tampão Tris-Acetato-EDTA (TAE) 50X:**

242 g Tris-base

57,1 ml Ácido acético glacial

100 ml 0,5 M EDTA, pH 8.0

Adicionar água para 1000 ml

**7. Tampão de aplicação 3X (SDS-PAGE):**

187,5 mM Tris-HCl pH 6,8

30% (p/v) de Glicerol

6% (p/v) SDS

0,03% (p/v) Azul de Bromofenol

Perfazer o volume restante com água destilada. Aliquotar e manter congelado

(-20°C)

**8. Solução Rouge Ponceau**

0.1% (w/v) Ponceau S

5% (v/v) ácido acético

Adicionar ddH<sub>2</sub>O

**9. TBS:**

0,1 M Tris-HCl

150 mM NaCl

pH 7,5

**10. Tampão de lavagem (TBS-T):**

0,1% Tween 20 em TBS

**11. Tampão de bloqueio:**

10% *Blotting Grade Blocker NonFat Dry Milk* (Bio-Rad, EUA) em TBS

**12. Tampão de corrida para *Western-blot* (TOWBIN):**

25 mM Tris-base

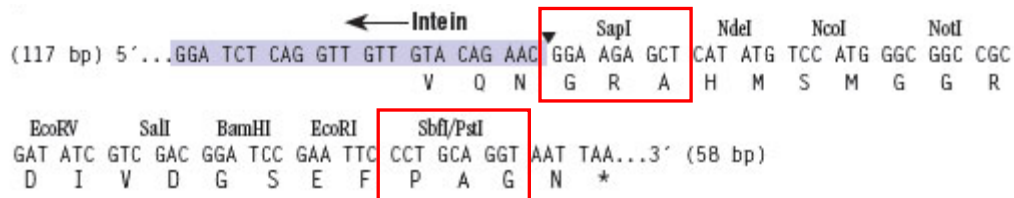
0,192 M Glicina

20% Metanol

## Anexo 2: Plasmídeos e estirpes bacterianas

### Características do vetor plasmídico pTYB21

A)



B)

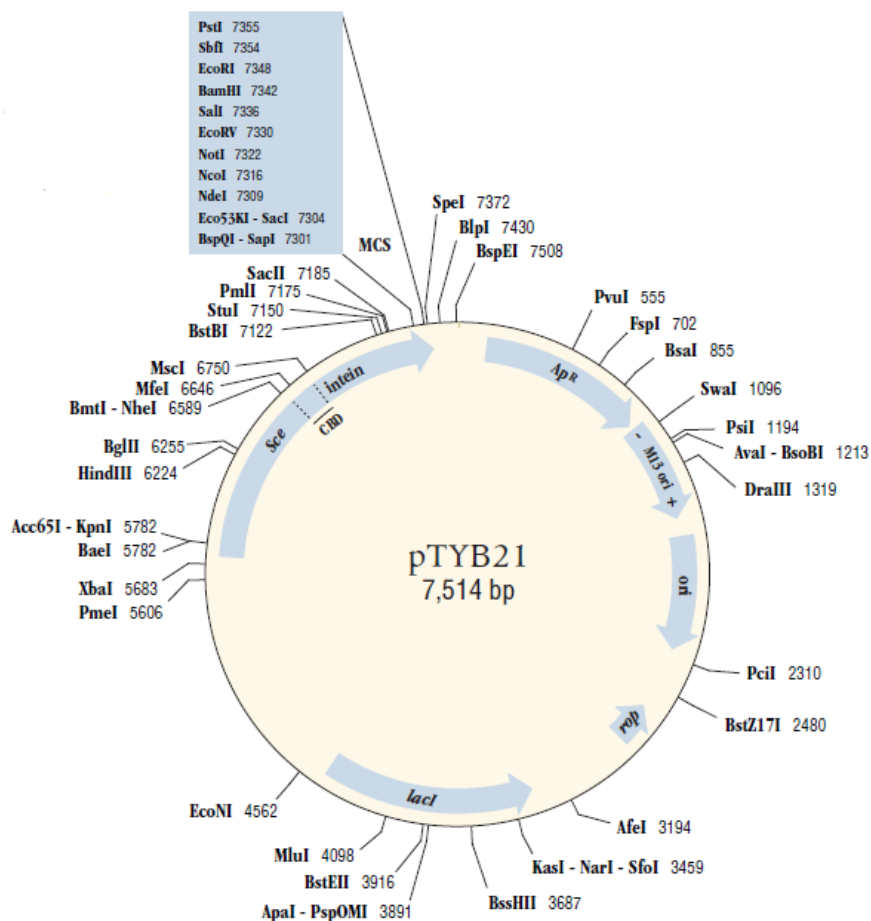
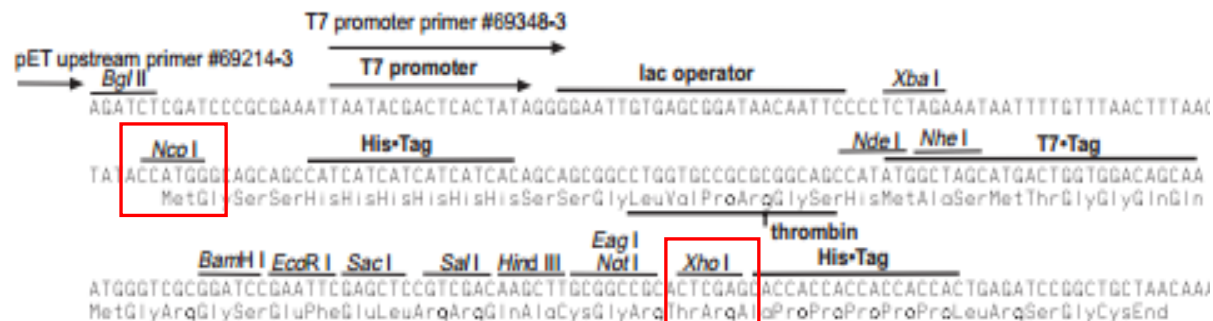


Figura 1 – A) Sequência nucleotídica e de aminoácidos do local de clonagem múltiplo (MCS), indicando o local de clivagem da inteína e os locais de restrição usados na clonagem. B) Esquema representativo do mapa de restrição do vetor pTYB21.

## Características do vetor plasmídico pET-28b(+)

A)



B)

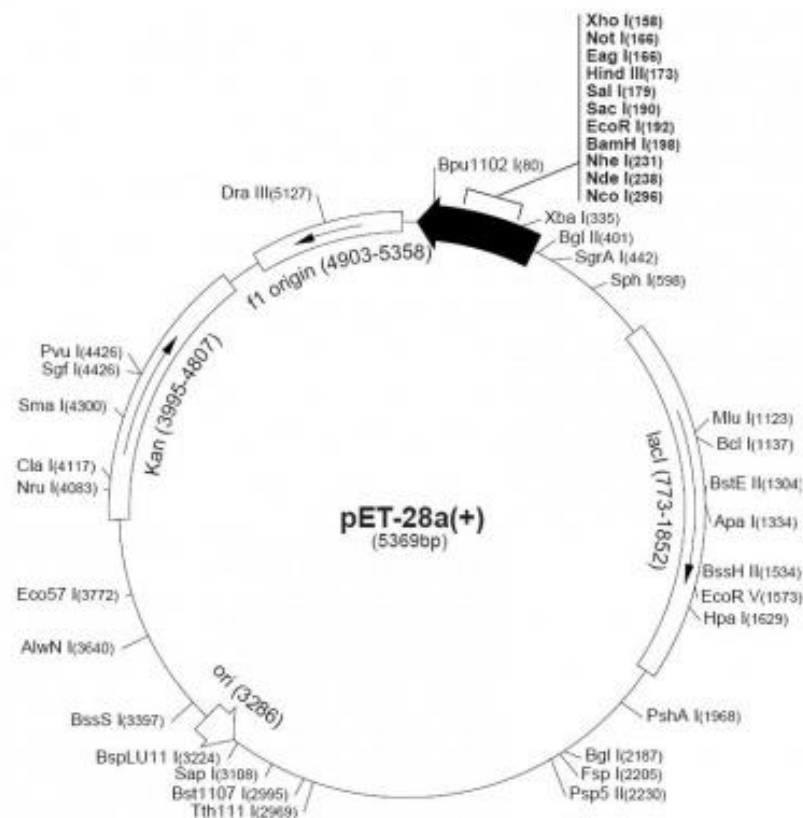


Figura 2 – A) Sequência nucleotídica e de aminoácidos do local de clonagem múltiplo (MCS) de pET-28b(+), indicando as sequências codificadoras das caudas de histidina e os locais de restrição usados na clonagem. B) Esquema representativo do mapa de restrição do vetor pET-28a(+), semelhante ao do vetor pET-28b(+) (Novagen, EUA) mas com inversão do MCS.

## ER2566

*F- λ- fhuA2 [lon] ompT lacZ::T7 gene 1 gal sulA11 Δ(mcrC-mrr)114::IS10 R(mcr-73::miniTn10-TetS)2 R(zgb-210::Tn10)(TetS) endA1 [dcm]*

## BL21 pLysS

*F- ompT hsdSB (rB- mB-) gal dcm pLysS (CmR)*

## Rosetta pLysS

*F- ompT hsdSB(rB- mB-) gal dcm lacY1 pRARE6 (CmR)*

## Origami

*Δ ara-leu7697 Δ lacX74 Δ phoAPvuII phoR araD139 ahpC galE galK rpsL F'[lac+(lacIq)pro] gor522 ::Tn10 (TcR) trxB::kan*

**Figura 3 - Génotipos das estirpes de *E. coli* utilizadas.** (Retirado de manual pET System, Novagen)